

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

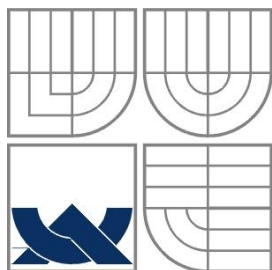
CHARAKTERIZACE MEDICÍNSKÝCH BIOPOLYMERŮ
ULTRAZVUKOVOU SPEKTROSKOPIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ADAM JUGL

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

CHARAKTERIZACE MEDICÍNSKÝCH BIOPOLYMERŮ ULTRAZVUKOVOU SPEKTROSKOPIÍ

CHARACTERIZATION OF MEDICAL BIOPOLYMERS BY ULTRASOUND SPECTROSCOPY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ADAM JUGL

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. ANDREA KARGEROVÁ

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0793/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Adam Jugl	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	Ing. Andrea Kargerová	
Konzultanti:	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	

Název bakalářské práce:

Charakterizace medicínských biopolymerů ultrazvukovou spektroskopií

Zadání bakalářské práce:

1. Seznámit se s metodou ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a jejím využitím v koloidní chemii.
2. Navrhnout experimenty zkoumající vliv koncentrace a teploty na ultrazvukové parametry roztoků hyaluronanu.
3. Realizovat a vyhodnotit experimenty.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska chování hyaluronanu v roztoku, zejména s ohledem na jeho medicínské využití.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Adam Jugl
Student(ka)

Ing. Andrea Kargerová
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením byly zkoumány vlastnosti roztoků hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti v závislosti na koncentraci a teplotě roztoku. Dále byl zkoumán vliv iontové síly na vlastnosti roztoků pomocí rozpouštění hyaluronanu v 0,15 M vodném roztoku chloridu sodného. Pro vyhodnocení vlastností roztoků byly výsledky porovnávány s vodnými roztoky karagenanu. Bylo zjištěno, že hyaluronan se v roztocích chová stále stejně a nedochází u něho k žádným změnám, nezávisle na hmotnosti, teplotě či koncentraci.

Abstract

Using high resolution ultrasonic spectroscopy has been investigated hyaluron solutions of various molecules weights depending on their concentration and solution temperature. Furthermore, the influence of ionic strength on the properties of solutions by dissolving hyaluronan in 0.15 M aqueous solution of sodium chloride. For comparison the properties of the hyaluronan solutions were compared with aqueous solutions of carrageenan. It was found that hyaluronan in solution behaves the same, regardless of the weight, temperature and concentration.

Klíčová slova

ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, hyaluronan, karagenan

Keywords

high resolution ultrasonic spectroscopy, hyaluronan, carrageenan

Citace

JUGL A. *Charakterizace medicínských biopolymerů ultrazvukovou spektroskopií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Andrea Kargerová

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Adam Jugl

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Andree Kargerové za trpělivost, připomínky a pomoc při měření, bez kterých by tato bakalářská práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěl poděkovat Prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., díky jehož přispění jsem mohl pracovat na takto zajímavém tématu, taktéž za jeho odborné rady.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1	Hyaluronan a jeho vlastnosti	7
2.1.1	Historie	7
2.1.2	Struktura kyseliny hyaluronové	7
2.1.3	Hyaluronan v medicíně	12
2.2	Karagenan a jeho vlastnosti	13
2.3	Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením	16
2.3.1	Princip měření	17
2.3.2	Praktické využití ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1	Použité chemikálie.....	20
3.2	Příprava roztoků	20
3.2.1	Příprava zásobního roztoku NaCl	20
3.2.2	Příprava zásobních roztoků hyaluronanu	20
3.2.3	Příprava zásobního roztoku karagenanu	21
3.3	Měření ultrazvukové rychlosti.....	21
3.4	Vyhodnocení dat a diskuze.....	22
3.4.1	Hyaluronan a jeho vlastnosti	22
3.4.2	Karagenan a jeho vlastnosti.....	29
4	ZÁVĚR.....	31
5	CITACE	33
6	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	35
7	PŘÍLOHY.....	36

1 ÚVOD

Hyaluronan, taktéž zvaný kyselina hyaluronová nebo zkráceně jen HA, byl poprvé izolován v roce 1934 Karlem Mayerem z očního sklivce skotu. Hyaluronan je látka tělu vlastní, jejíž koncentrace v organismu s věkem klesá. Vyskytuje se v synoviální tekutině, kůži, pojivových tkáních, sklivci oka nebo pupeční šňůře. Tělo umí hyaluronan syntetizovat i odbourávat. Původně byl hyaluronan extrahován z kravích očí nebo kohoutích hřebínků. V dnešní době se pro výrobu hyaluronanu ve velkých množstvích používá mikrobiální fermentace.

Jedná se o látku dobře známou i široké veřejnosti, neboť je přidáván do mnoha kosmetických produktů především díky jeho schopnostem redukovat vrásky a vyhlazovat pleť. Obě tyto vlastnosti však nejsou trvalého charakteru a je nutné jeho aplikaci opakovat. V lékařství se v dnešní době hyaluronan využívá v oftalmologii při výměně čoček, v ortopedii pro své lubrikační účinky, také při hojení ran.

Výzkum hyaluronanu v současnosti je orientován především na léčbu rakoviny, kde by měl hyaluronan sloužit jako prostředek k léčení. V rakovinné tkáni je obvykle prokázán vyšší obsah hyaluronanu než v tkáni zdravé. Hyaluronan podporuje proliferaci rakovinných buněk, tvorbu metastáz a slouží také jako prostředek maskující jejich přítomnost před imunitním systémem. Zvýšená přítomnost těchto receptorů by měla sloužit jako prostředek k zacílení léčby rakoviny, kde by léčivo vázané na hyaluronan bylo spolu s ním vtaženo do rakovinné tkáně.

Hlavním cílem této práce je popsat chování hyaluronanu ve vodném i fyziologickém roztoku za různých teplot, koncentrací i molekulových hmotností hyaluronanu pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením. Protože není možné získané výsledky srovnat s žádnou podobnou prací, byly výsledné hodnoty srovnávány s výsledky měření roztoku karagenanu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hyaluronan a jeho vlastnosti

Hyaluronan můžeme nalézt u všech obratlovců, vyskytuje se jako obal některých druhů streptokoků, kteří pravděpodobně převzali aparát pro syntézu z některého z hostitelských organismů. Název hyaluronan je používán především pro zdůraznění polysacharidové struktury a skutečnosti, že se v živých organismech vyskytuje jako polyaniont. [1, 2, 3]

Hyaluronan se vyskytuje v extracelulární matrix pojivových tkání, uvnitř buněk a v pokožce, kde je ho obsaženo asi polovina z celkového množství v lidském těle. Celkově je ho v lidském těle obsaženo asi 20 g. Hyaluronan byl připravován ze sklivců, kohoutích hřebínků a pupečních šňůr. Ve sklivci lidského oka se hyaluronan vyskytuje v koncentraci 0,1 – 0,4 mg/g mokré váhy, což odpovídá koncentraci 0,001 – 0,004 % hmotnosti. V synoviální tekutině je koncentrace hyaluronanu ještě větší a dosahuje koncentrací 0,03 – 0,04 % hmotnosti. V kohoutích hřebíncích je koncentrace nejvyšší a to 0,075 % mokré hmotnosti. V dnešní době se však pro produkci ve velkých množstvích uplatňuje především produkce hyaluronanu pomocí bakterií například *Streptococcus zooepidemicus*. [1, 2, 3, 4, 5]

2.1.1 Historie

Hyaluronan poprvé popsali v roce 1934 Meyer a Palmer, jejich kyselina obsahovala uronové kyseliny. Poprvé byl čistý hyaluronan připraven ve druhé polovině devatenáctého století. Název kyselina hyaluronová je složen ze slova *hyalos*, což je latinský výraz pro sklo, a *uronové kyseliny*. Karl Meyer, často chybně označovaný za objevitele hyaluronanu, pouze oživil výzkumné práce, definoval několik jeho vlastností a izoloval hyaluronan ze sklivce oka skotu. Přesné složení hyaluronanu bylo objeveno koncem čtyřicátých let dvacátého století a na počátku let padesátých. [5, 6]

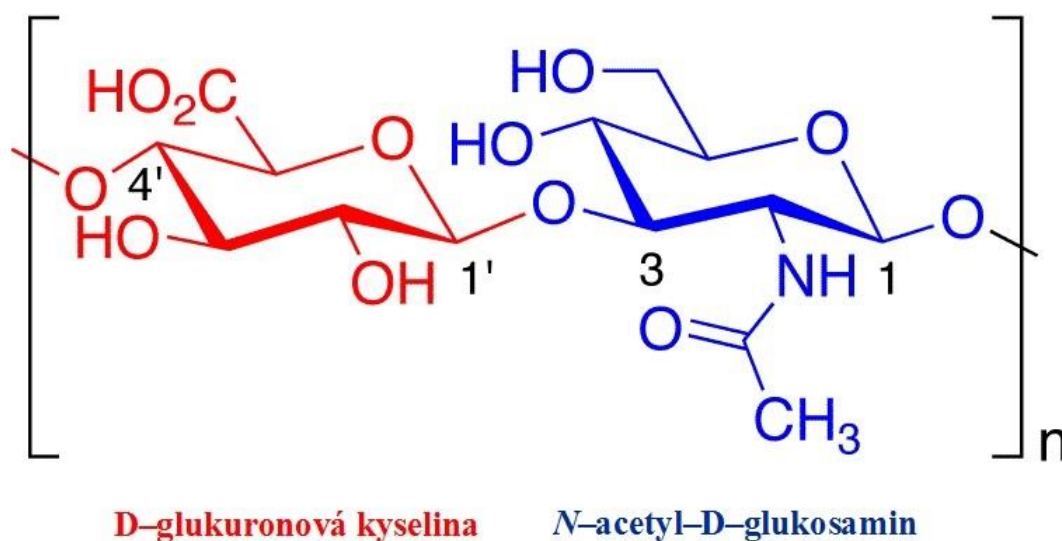
V průběhu šedesátých a sedmdesátých let dvacátého století byla intenzivně studována fyzikálně – chemická podstata hyaluronanu. Faser a Laurent předložili přehled fyzikálních a chemických vlastností hyaluronanu včetně jeho primární a sekundární struktury. [6]

2.1.2 Struktura kyseliny hyaluronové

2.1.2.1 Chemická struktura

Hyaluronan je nevětvený polysacharid složený z disacharidových podjednotek obsahujících D – glukuronovou kyselinu a N – acetyl – D – glukosamin. Jednotlivé

monosacharidy jsou spojené $\beta(1' - 3)$ glykosidickými vazbami a jednotlivé disacharidové podjednotky jsou spojeny $\beta(1 - 4')$ glykosidickými vazbami, jak ukazuje **Obrázek 1**. Atomy kyslíku spojující D – glukuronovou kyselinu a N – acetyl – D – glukosamin umožňují jejich teoretickou rotaci o celých 360° , tato rotace je však omezena pouze na několik možných konfigurací. Jak D – glukuronová kyselina, tak N – acetyl – D – glukosamin vychází z glukosy a u obou monosacharidů prostorově objemné struktury jako jsou hydroxylové nebo karboxylová část se nachází ve stericky výhodnější ekvatoriální poloze, na rozdíl od vodíkových atomů, které leží v axiálních polohách. Toto uspořádání je energeticky velmi stabilní. [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8]



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové [9]. Základ tvoří opakující se disacharidové jednotky D – glukuronové kyseliny a N – acetyl – D – glukosaminu [6].

Jedná se o zástupce záporně nabitých glykosaminoglykanů, mezi které ještě patří například chondroitin, keratan nebo heparan sulfát. Tyto záporně nabitě glykosaminoglykany se vyskytují na rozdíl od hyaluronanu v mnoha isomerech. Karboxylová skupina glukuronové kyseliny má své pK kolem 3 – 4 v závislosti na iontové síle. Při pH 7 se tedy vyskytuje v ionizované podobě jako polyaniont, který má přidružené vyměnitelné kationty tak, aby byl elektroneutrální. Mezi tyto vyměnitelné ionty patří například Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Tyto vyměnitelné kationty jsou velmi důležité při rozpouštění ve vodě, neboť hyaluronan, který má na všech karboxylových skupinách vázané methylové skupiny esterovou vazbou, je ve vodě zcela nerozpustný. [1, 3, 4, 7]

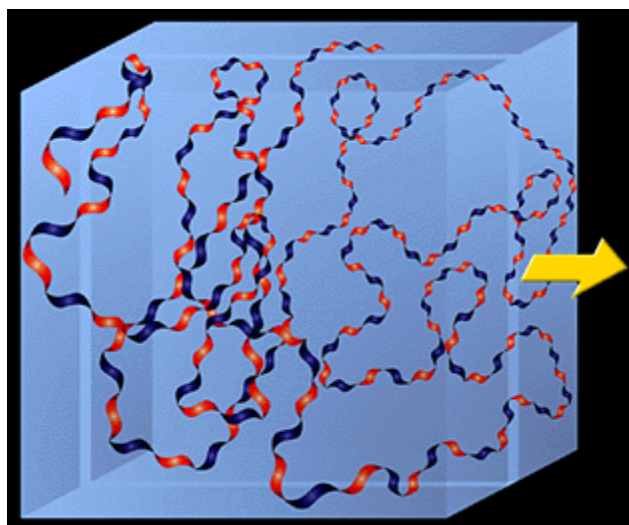
2.1.2.2 *Struktura polymeru*

Enzymy syntetizující kyselinu hyaluronovou skládají tento řetězec z opakujících se jednotek glukuronové kyseliny a N – acetylglukosaminu přímo na plazmatické membráně. Syntetizovaný řetězec je vytlačován z buňky přímo do extracelulární matrix, na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které jsou syntetizovány v Golgiho aparátu. Využívají se přitom aktivované nukleotidové cukry UDP – glukuronovou kyselinu a UDP – N – acetylglukosamin. Množství opakujících se disacharidových jednotek může dosáhnout 10 000 i více. Každá disacharidová podjednotka odpovídá asi 400 daltonům, celý řetězec může tedy snadno dosáhnout molekulové hmotnosti až 4 milióny daltonů. Natažený řetězec s 10 000 opakujícími se disacharidovými jednotkami měří při natažení asi 10 μm , což je zhruba velikost lidské červené krvinky. [3, 5]

V pevném stavu se hyaluronan, jak dokázala Struther Arnottova skupina, může vyskytovat v dvoušroubovicovém uspořádání, ale pouze ve speciálních podmínkách neodpovídajících podmínkám fyziologickým. [7]

2.1.2.3 *Struktura v roztoku*

Páteř molekuly hyaluronanu ve fyziologických roztocích je tvořena kombinací kovalentních chemických vazeb spojujících disacharidové jednotky, intramolekulárních vodíkových můstků a interakcí s rozpouštědlem. Protože má molekula hyaluronanu v axiálních polohách pouze vodíky, tvoří tyto části molekuly hydrofobní místa. Naopak hydrofilní části jsou tvořeny ekvatoriálně ležícími objemnými skupinami. Toto uspořádání vede k tomu, že molekula hyaluronanu vytváří v roztoku plochou, stuhu připomínající, kroutící se strukturu, jak je možné vidět na **Obrázku 2**. [3]

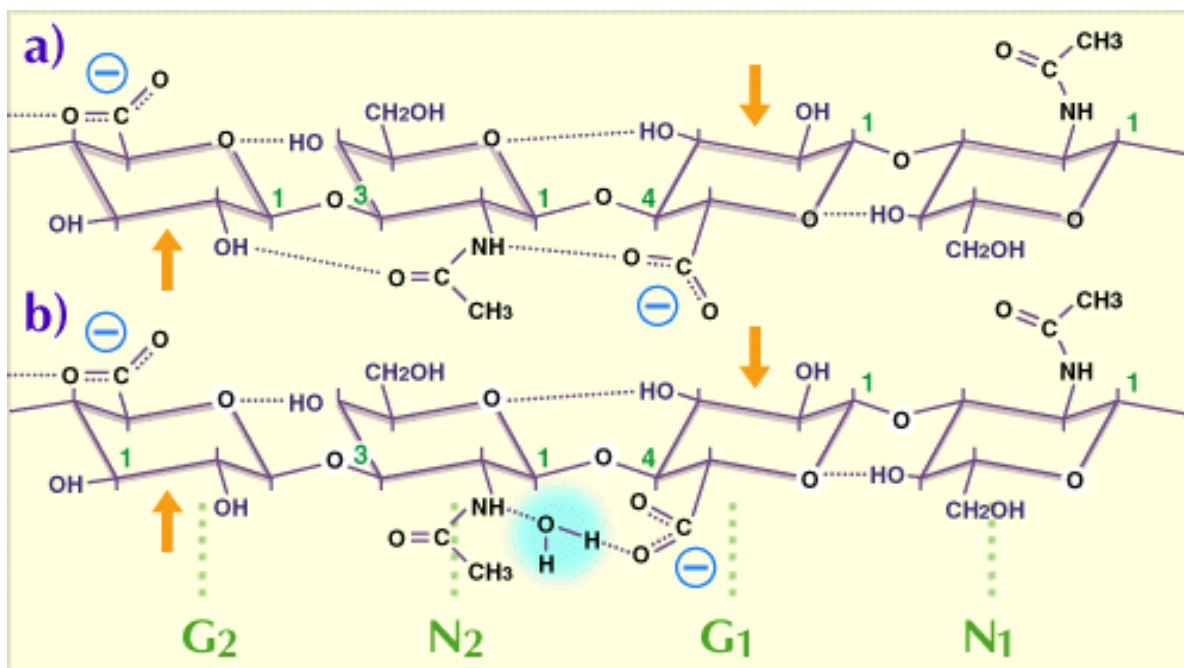


Obrázek 2: Červené a modré části reprezentují hydrofilní a hydrofobní části řetězce hyaluronanu. [3]

Ve fyziologických podmínkách molekula hyaluronanu zaujímá tvar rozsáhlého náhodného klubka, který zabírá velké množství prostoru. Tato struktura se jeví jako velmi důležitá, neboť malé molekuly jako voda nebo elektrolyty mohou touto strukturou volně procházet, zatímco velké molekuly jako například proteiny jsou zadržovány a nemají místo k pohybu z důvodu velké hydrodynamické velikosti v roztoku. Síť tvořená vlákny hyaluronanu se navíc neustále pohybuje, proto vznikají a zanikají póry o různých velikostech. Je tedy možné, aby i velké molekuly touto sítí prošly, byť jim průchod skrz bude trvat déle než malým molekulám.[3, 5]

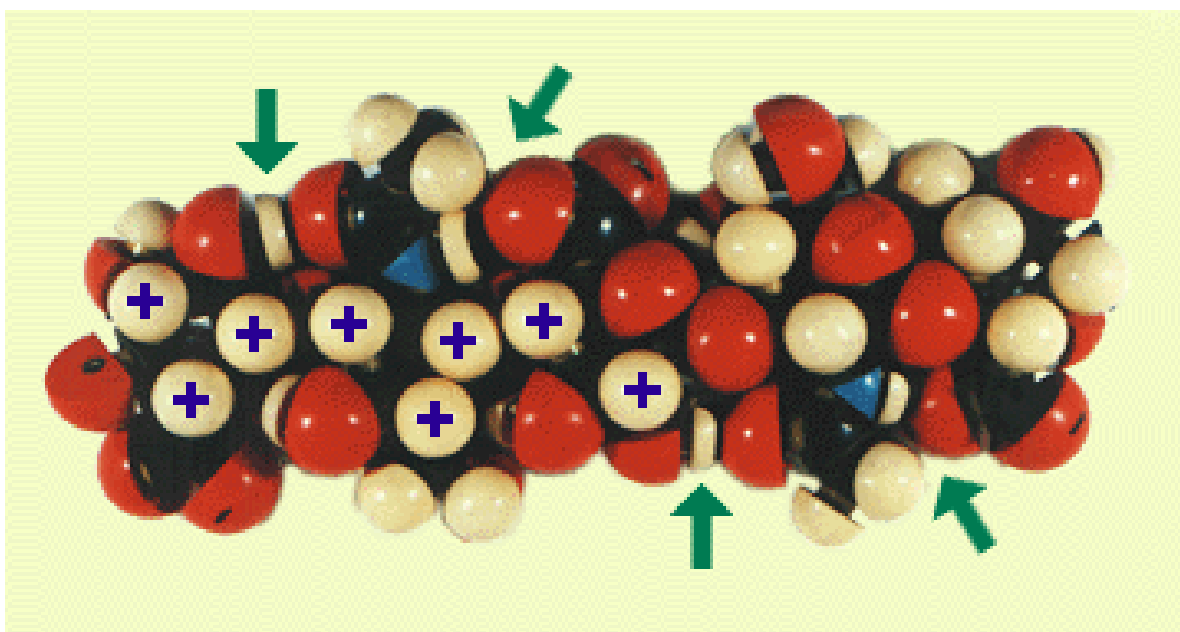
V biologických systémech platí pravidlo, že čím je systém více náhodný, tím méně informací obsahuje. Všechny živé organismy snižují entropii na úkor okolí. Snižování entropie jde ruku v ruce se zvyšováním informací v systému a využíváním trvalých a reprodukovatelných tvarů. Proto se zdá pravděpodobné, že hyaluronan, který má řadu biologických rolí, by měl mít preferovanou strukturu. Po desetiletí vědci pomocí klasických metod polymerní chemie jako ultracentrifugací, viskozimetrií nebo pomocí rozptylu světla zkoumaly vlastnosti molekul hyaluronanu v roztoku a věřili, že tvoří náhodné smyčky. [7]

První experimenty, které indikovaly, že hyaluronan má určitý preferovaný tvar, byly oxidace jodistanem, kde struktura hyaluronanu byla oxidaci odolná, na rozdíl od identických struktur obdobných polymerů. Na základě NMR a molekulárních modelů byla potvrzena struktura, ve které se v roztocích vyskytují rozsáhlé vodíkové interakce v molekule hyaluronanu. Jak bylo uvedeno v části **Chemická struktura**, glykosidické vazby spojující D – glukuronovou kyselinu a N – acetyl – D – glukosamin v řetězec jim umožňují rotaci o teoretických 360°, ve skutečnosti však dochází na každé glykosidické vazbě k obratu pouze o 180°. Jedná se o dvoušroubovici složenou z jednoho vlákna, ve kterém molekuly vody hrají důležitou úlohu při stabilizaci, nikoliv o dvoušroubovici složenou ze dvou vláken. Celá struktura takto vystavěného řetězce je ukázána na **Obrázku 3**. Ostatní glykosaminoglykany mají ve vodním prostředí snahu vytvářet podobnou strukturu. [7]



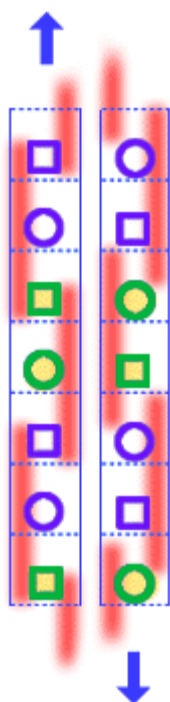
Obrázek 3: Řetězec a) ukazuje strukturu části hyaluronanu v nevodném rozpouštědle dimethylsulfoxidu, řetězec b) ukazuje strukturu ve vodném prostředí. Šipky označují místa, která jsou odolná k oxidaci jodistanem. G = kyselina D – glukuronová, N = N – acetyl – D – glukosamin. [7]

Dle Johna E. Scotta obsahuje molekula hyaluronanu v konformaci dvoušroubovice kromě hydrofilních částí také části hydrofobní o velikosti osmi –CH– jednotek, jak ukazuje **Obrázek 4**. To dělá z hyaluronanu amfifilní molekulu. Tyto hydrofobní oblasti mají na molekuly ve vodném prostředí velký vliv, neboť hydrofobní molekuly mají tendenci se shlukovat a snižovat tak maximálně kontakt s molekulami rozpouštědla. [7]



Obrázek 4: Vodíkové atomy označené křížkem znázorňují hydrofobní oblast hyaluronanu. [7]

Ve vodě hyaluronan agreguje sám se sebou částečně pomocí hydrofobních míst a zaujímá preferovaný tvar. Sekundární struktura má výjimečné vlastnosti. Obě strany jsou identické, ale antiparalelní, z tohoto důvodu, co je možné na jedné straně, je možné i na straně druhé. Agregáty mohou růst z obou stran, což umožňuje vytváření síťovité struktury už při nízkých koncentracích. Elektro – statické odpuzování mnoha negativních nábojů, které by podporovalo disociaci agregátů, je vyváženo hydrofobními interakcemi i tvorbou vodíkových vazeb mezi acetamidovými a karboxylátovými skupinami. Jedná se o interakce velmi krátkého dosahu, a nejlépe jich je dosaženo, když jsou řetězce hyaluronanu antiparalelně uspořádány, jak ukazuje **Obrázek 5**. [5, 7]



Obrázek 5: Znáznornění možného duplexu mezi dvěma molekulami hyaluronanu. V řetězcích je antiparalelní uspořádání. [7]

Pozorování pomocí elektronové mikroskopie odhalilo, že vysokomolekulární i nízkomolekulární hyaluronan tvoří při nízkých koncentracích (1 mg/ml) sítě. V případě vysokomolekulárního hyaluronanu se jedná o síť, kde není patrný žádný konec nebo začátek molekuly. Nízkomolekulární hyaluronan tvoří při stejné koncentraci sítě, které jsou od sebe vzájemně odděleny. Interakce držící sítě pohromadě jsou poměrně slabé, proto dochází k rozpadům sítí a jejich opětovné tvorbě v závislosti na podmínkách a teplotě. [7]

2.1.3 Hyaluronan v medicíně

Hyaluronan není cytotoxický ani imunogenní, naopak je biokompatibilní a biodegradabilní. Hyaluronan se navíc v těle běžně vyskytuje a rozkládá na jednoduché cukry.

Snad právě proto jsou projevovány snahy o jeho využití v medicíně. Úplně první využití hyaluronanu v medicíně spadá do pozdních padesátých let dvacátého století, kdy byl hyaluronan využit při operaci očí. Hyaluronan, konkrétně hyaluronan sodný izolovaný z kohoutích hřebínků, se v lékařství využívá speciálně pro oftalmologii z důvodů jeho vysoké molekulové hmotnosti, navíc se v oku přirozeně vyskytuje. Hyaluronan je využíván při operacích šedého zákalu kvůli udržování operativního prostoru a pro ochranu rohovky nebo jiných částí oka proti fyzickému poškození během výměny čočky. [3, 5, 10]

Největším úspěchem hyaluronanu v medicíně je jeho využití při léčbě artrózy. Léčba probíhá pomocí injekcí hyaluronanu do kloubů, kdy postiženým zpomaluje opotřebování chrupavky, vrací do normálu vlastnosti synoviální tekutiny a zmenšuje míru bolesti. V běžné chirurgii je hyaluronan využíván také jako antiadhezní prostředek a prostředek proti jizvám. [5, 10, 11]

Velké množství experimentálních důkazů ukazuje, že v rakovinné tkáni je výskyt hyaluronanu obvykle vyšší než ve zdravé tkáni. Hyaluronan v nádoru podporuje rychlou proliferaci rakovinných buněk, tvorbu metastáz a také pomáhá nádoru vyhnout se sledování ze strany imunitního systému. [5]

Hyaluronan v rakovinné tkáni však není pouze na škodu. Vzhledem k velkému počtu receptorů exprimovaných na povrch buněk rakovinné tkáně je snaha hyaluronan využívat jako nosič pro protinádorová léčiva. Struktura hyaluronanu navíc poskytuje dostatek rozdílných chemických skupin pro navázání léčiva. Nízkomolekulární hyaluronan je využíván právě při protinádorové léčbě. Konjugáty léčiva a hyaluronanu jsou vtaženy do nádorových buněk pomocí endocytózy. Následně dochází k rozpadu konjugátu a cytotoxické léčivo je uvolněno do buňky. [5, 11, 12]

2.2 Karagenan a jeho vlastnosti

Karagenan je souhrnný název pro skupinu ve vodě rozpustných sulfátových polysacharidů s vysokou molekulovou hmotností, izolovaných z červených mořských řas. Hlavní zdroje, ze kterých je karagenan izolován, jsou vypsány v **Tabulce 1**. Mezi nejvýznamnější patří řasa *Chondrus crispus*. Rozlišujeme tři nejrozšířenější druhy karagenanu. Jedná se o kappa (κ), lambda (λ) a iota (ι) karagenan. Hlavním rozdílem mezi kappa, iota a lambda karagenanem je především v tvorbě gelu. Kappa karagenan působením draselných iontů tvoří gel, zatímco lambda a iota karagenan je vůči působení draselných iontů imunní. Rozpustnost karagenanu ve vodě závisí na typu karagenanu, pH, obsahu solí nebo

teplotě. Obecně platí, že nejvíce rozpustný je lambda karagenan, protože ve svém řetězci neobsahuje hydrofobní 3,6 – anhydrogalakózu a naopak je jeho řetězec nejvíce sulfátován. [5, 13, 14]

Různé druhy karagenanu jsou obecně složeny z lineární galaktóзовé páteře, která je v závislosti na typu karagenanu sulfátována. κ – karagenan je polysacharid složený z D – galaktózy a 3,6 – anhydro – D – galaktózy v přibližně ekvimolárních množstvích, má rozvětvenou strukturu s molekulovou hmotností až $2,8 \cdot 10^5$ Da. λ – karagenan je složen téměř výhradně ze sulfátované D – galaktózy s molekulovou hmotností mezi 4 až $7 \cdot 10^5$ Da. Strukturu ideálního řetězce různých typů karagenanu znázorňuje **Obrázek 6**. Struktura 3,6 – anhydro – D – galaktopyranosových jednotek umožňuje struktuře kappa a iota karagenanu vytvářet terciální spirálovitou strukturu, která je nezbytná pro tvorbu gelu. Kromě D – galaktózy a 3,6 – anhydro – D – galaktózy jako nejvýznamnějších zbytků cukrů a sulfátové skupiny jako hlavního substituentu vyskytujících se v řetězci, může řetězec obsahovat i další cukerné zbytky jako glukózu, xylózu nebo uronové kyseliny. Mezi další možné substituenty patří například metyl nebo ethery. Zastoupení sulfátových skupin v řetězci kolísá od 0 do 41 hmotnostních procent v závislosti na typu karagenanu. Nejvíce jsou sulfátovány řetězce lambda karagenanu, zatímco kappa karagenan je modifikován nejméně. [5, 13, 14]

Kappa a iota karagenan mohou existovat v roztoku ve dvou formách a to jako náhodné klubko, v tomto stavu se vyskytují typicky za zvýšené teploty, nebo jako dvojité šroubovice, která se obvykle tvoří při ochlazování roztoku. K přechodu mezi náhodným klubkem a dvojitou šroubovicí dochází při určité teplotě. Tato teplota je závislá na vlastnostech řetězce konkrétního karagenanu, jako je rozložení sulfátových skupin, a na vnějších podmínkách, jako jsou koncentrace a druh solí, pH a rychlost ochlazování. Při teplotě kolem 60 °C se κ – karagenan ve vodě nachází vždy ve stavu náhodného klubka a v závislosti na jeho detailní struktuře se teplota přechodu mezi klubkem a šroubovicí pohybuje přibližně kolem 38 °C. V přítomnosti draselných iontů dochází ke shlukování dvojitých šroubovic do větších jednotek. [5]

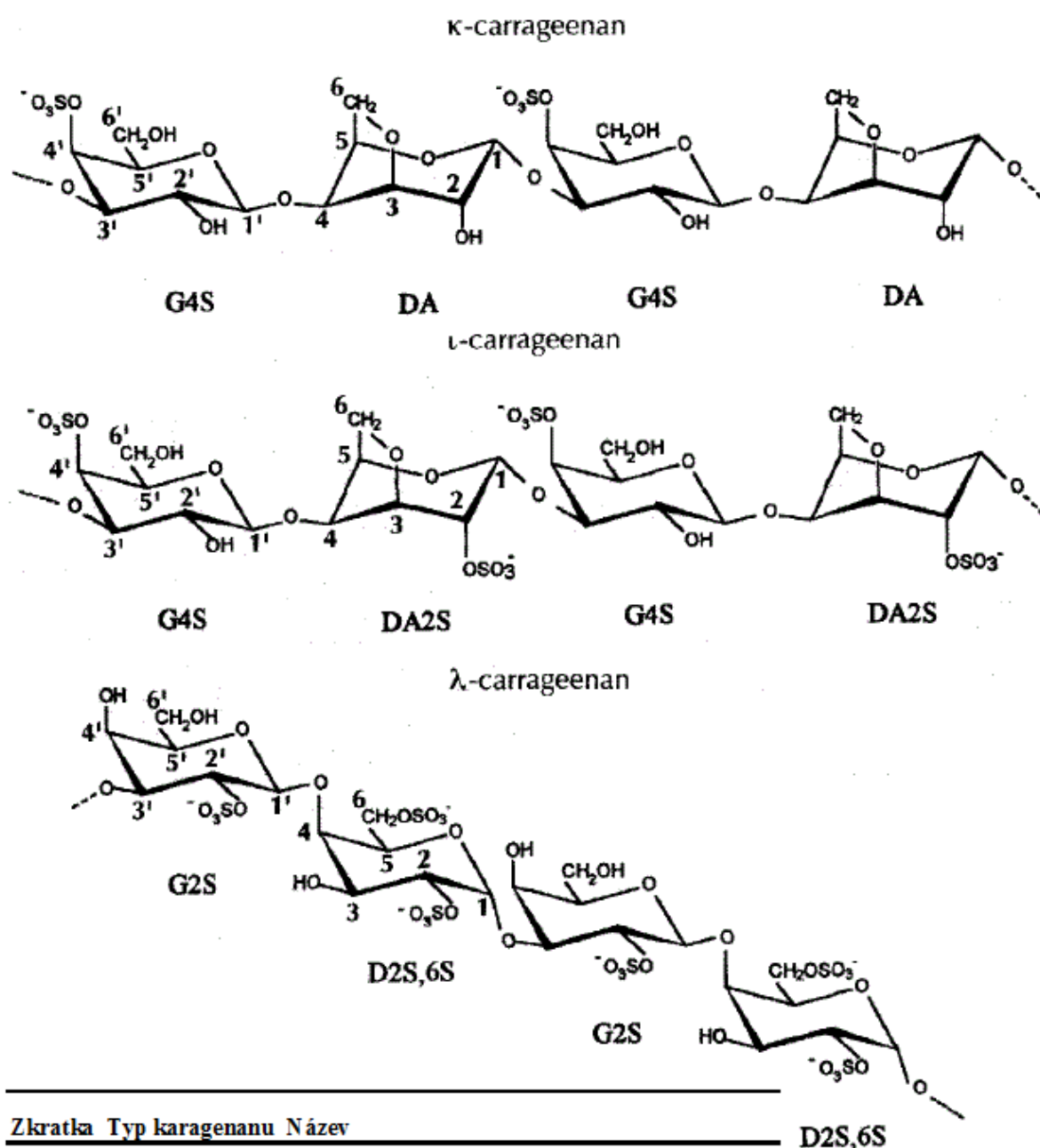
Depolymerizace karagenanu může nastat pomocí acidifikace roztoku díky uvolňování sulfátových skupin, jako výsledek dialýzy v deionizované vodě. V gelové formě je karagenan chráněn proti účinkům autohydrolýzy. [5]

U karagenanu s molekulovou hmotností kolem 100 kDa bylo prokázáno, že je bezpečný a netoxický, proto může být přidáván do jídla v neomezeném množství, především jako stabilizátor E 407. Injekce karagenanu se v medicíně používají k vyvolání zánětlivé reakce

jeho přímým podáním do oběhového systému. Taktéž se věří, že karagenan by mohl zabránit nebo inhibovat rozvoj pohlavně přenosných virových nemocí, především HIV. Komplexy mezi karagenanem a molekulami léčiva se využívají pro kontrolované uvolňování léčiv. [5]

Tabulka 1: Produkce různých typů karagenanu v závislosti na druhu řasy, ze které je izolován. [15]

Druh řasy	Typ karagenanu
<i>Chondrus crispus</i>	κ a λ
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	κ
<i>Eucheuma denticulatum</i>	ι
<i>Gigartina skottsbergii</i>	κ, částečně λ
<i>Sarcothalia crispata</i>	κ a λ



Obrázek 6: Znázornění ideálního uspořádání řetězců κ, λ, ι - karagenanu. [14]

2.3 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením

Ultrazvuk se v medicíně využívá po desetiletí. Pro analýzu vlastností jednotlivých materiálů se však příliš nehodil. Mezi jeho hlavní problémy patřilo nízké rozlišení a velké

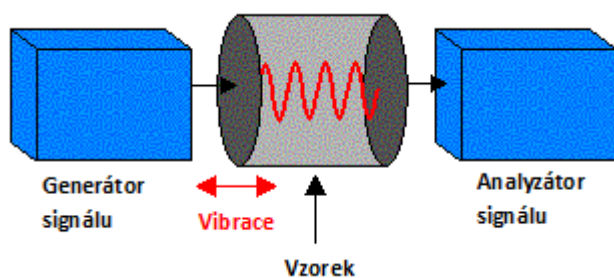
množství vzorku, které bylo pro analýzu zapotřebí. Všechny tyto problémy byly však odstraněny s rozvojem elektroniky. [16]

Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, zkráceně HRUS z anglického high resolution ultrasonic spectroscopy, je podobná všem ostatním spektroskopiím s jediným rozdílem a to, že oproti většině klasických spektroskopií nevyužívá k analýze elektromagnetické záření, ale zvukové vlny. Protože jsou zvukové vlny vytvářeny elektronicky, není potřeba na rozdíl od elektromagnetických vln, které pochází většinou ze světelného zdroje, je nadále přečišťovat a je možné zkoumat vzorek ve více frekvencích současně. Navíc tento rozdíl dovoluje ultrazvukové spektroskopii analyzovat v podstatě jakýkoliv druh materiálu, včetně těch neprůhledných. [16]

2.3.1 Princip měření

Standardní měření ve spektrometru jsou prováděna jako komparativní, tj. měření probíhá jednak v referenční cele naplněné např. čistým disperzním prostředím, jednak v měřicí cele obsahující zkoumaný vzorek. [17]

Analýza materiálu pomocí ultrazvukové spektroskopie je založena na měření parametrů ultrazvukových vln šířících se skrz vzorek. Piezoelektrický převodník změny přicházející elektrický signál na ultrazvukovou vlnu, kterou posílá vzorkem. Na druhé straně vzorku, jak ukazuje **Obrázek 7**, je druhý piezoelektrický převodník, který zachycený signál v podobě ultrazvukové vlny zachytí a přemění na signál elektrický pro další analýzu. Vlna procházející vzorkem ztrácí část své energie a dochází ke zmenšení její amplitudy a změnám v rychlosti. Změny těchto vlastností ultrazvukové vlny jsou následně vyhodnocovány jako charakteristiky daného materiálu. [18]

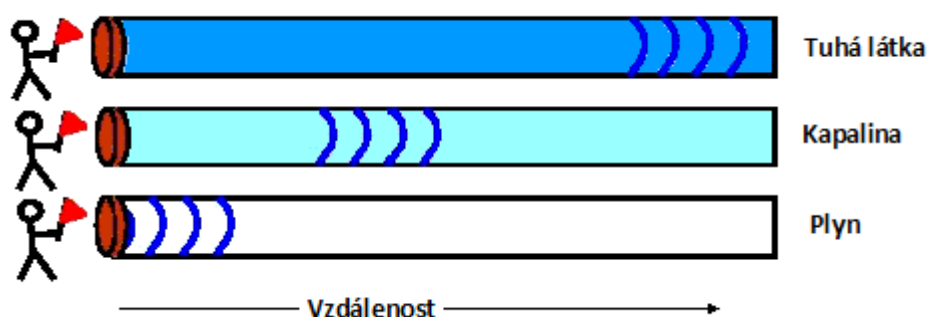


Obrázek 7: Schéma znázorňující princip měření ultrazvukového spektrometru. [18]

Ultrazvuková vlna procházející skrz vzorek způsobuje kompresi a dekompresi vzorku. Tyto změny ve vzorku jsou velmi malé. Díky tomu je ultrazvuková spektroskopie nedestruktivní technika. Ultrazvuková vlna působí na intermolekulární síly, které jsou

základní stavební jednotkou materiálu. Jedná se o jedinou techniku, která je schopná tyto síly měřit přímo. [19]

Rychlost s jakou se ultrazvuková vlna šíří vzorkem je ovlivňována elasticitou a hustotou vzorku. Elasticita materiálu je důležitějším znakem než hustota, jednak proto, že je velmi senzitivní na molekulární uspořádání a intermolekulové interakce, navíc také proto, že pevné látky mají vyšší modul pružnosti v porovnání s plyny a kapalinami. Proto zvuková vlna prochází rychleji skrze pevné materiály oproti kapalinám a plynům, jak ukazuje **Obrázek 8**. [20]



Obrázek 8: Rychlost průchodu zvukové vlny různými druhy prostředí. [20]

Zeslabení ultrazvukové vlny, tedy změna její amplitudy, závisí na velikosti ztracené energie při průchodu vzorkem. Čím nižší je ztráta energie, tedy čím snadněji vlna prochází, tím je vzorek více transparentní pro zvukové vlny. V homogenních vzorcích dochází ke ztrátám energie během komprese a dekomprese molekul ve vzorku. V nehomogenních vzorcích dochází ke snížení amplitudy vlny v důsledku rozptylu na částicích ve vzorku. [21]

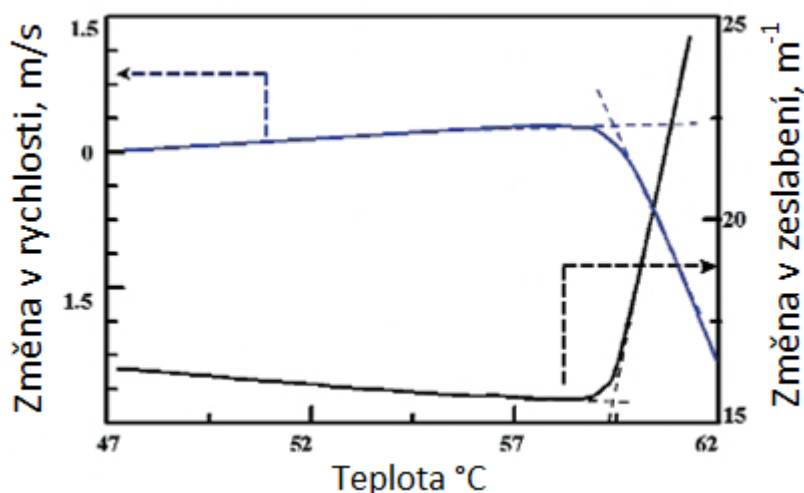
2.3.2 Praktické využití ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením

Typickým příkladem aplikace ultrazvukové spektroskopie jsou strukturní analýza, detekce a analýza chemických reakcí, detekce a analýza konformačních změn v polymerech a biopolymerech, micelizace a mnohé další. Dle V. Buckina [22] byla pomocí ultrazvukové spektroskopie zaznamenána enzymatická hydrolýza maltoheptózy.

Pomocí spektroskopie byla také měřena koagulace mléka při zahřívání. Jednalo se o rozdíl mezi odstředěným mlékem obohaceným o vápník, který by měl snižovat stabilitu micel kaseinu a snižovat tím koagulační teplotu, oproti odstředěnému neobohacenému mléku. Výsledkem bylo potvrzení této hypotézy. Koagulační teplotu je možné odečíst z grafu závislosti ultrazvukové rychlosti a zeslabení na teplotě, jak ukazuje **Obrázek 9**. Zvýšení zeslabení, jaké je na **Obrázku 9** patrné, je způsobeno díky zvětšení agregujících proteinů,

oproti tomu pokles ultrazvukové rychlosti je způsoben vznikem agregátů zpomalujících zvukovou vlnu. [23]

Všechny tyto uvedené experimenty ukazují na velkou citlivost ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením na uspořádání molekul ve vzorku [23].



Obrázek 9: Znázornění koagulační teploty mléka pomocí změny v ultrazvukové rychlosti a zeslabení v závislosti na teplotě. [23]

Pomocí ultrazvukové spektroskopie může být také měřena kritická micelární koncentrace. Jak uvádí prof. Pekař [17] ve svém článku, vznik micel se projeví snížením ultrazvukové rychlosti, neboť micely mají poměrně elastické jádro. Ve srovnání s prostředím bez micel je tedy takovéto prostředí mnohem pružnější, a proto dochází k poklesu ultrazvukové rychlosti. Při koncentraci nižší než je kritická micelární koncentrace, je každý přídavek tenzidu tvořícího micely zaznamenán lineárním nárůstem ultrazvukové rychlosti.

Při měření ultrazvukové rychlosti v roztocích hyaluronanu bylo dokázáno, že roztoky o vyšší koncentraci vykazují vyšší ultrazvukovou rychlost nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Toto zvýšení nastává díky rozpuštění tuhých polymerních řetězců a hydratačního pláště vytvořeného kolem nich. Je známo, že hydratační voda má nižší stlačitelnost než voda samotná, proto v systémech obsahujících hydratované molekuly dochází ke zvyšování ultrazvukové rychlosti. Stlačitelnost klesá s rostoucí teplotou při dané koncentraci hyaluronanu. Efekt teploty je mnohem více patrný než efekt koncentrace. Stlačitelnost vody je nejnižší při 64 °C. [8]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika)

Použité šarže jsou uvedeny v *Tabulce 2*.

Tabulka 2: Hyaluronan sodný použitý pro experimenty.

Hyaluronan		
M _w kDa	Šarže	M _w (*) kDa
10–30	211–589	17
	211–2069	15
	2012–2069	15
90–130	211–234	137
	213–6547	117
300–500	212–2082	430
	213–6349	341
1500–1750	212–1271	1697
	2013–4722	1669

M_w (*) je molekulová hmotnost získaná pomocí HPLC/SEC-MALS analýzy provedenou výrobcem.

Karagenan: Sigma Aldrich (Česká republika), CAS: 11114–20–8, šarže BCBK1080V

Chlorid sodný: Lachner (Česká republika), čistota 99,5%

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava zásobního roztoku NaCl

Pro přípravu zásobního roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,15 M bylo rozpuštěno 4,38 g NaCl v 500 cm³ ultra čisté deionizované vody z přístroje PURELAB. Roztok byl pro dokonalé promíchání ponechán před použitím 24 h na míchačce v uzavřené nádobě.

3.2.2 Příprava zásobních roztoků hyaluronanu

Zásobní roztoky hyaluronanu používané při práci byly připravovány přímým rozpouštěním hyaluronanu v ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB. Tato voda byla používána i při přípravě všech dalších roztoků a měření. Všechny komponenty roztoku, tedy hyaluronan i voda, byly váženy. Zásobní roztoky se před dalším ředěním na požadované koncentrace nechaly 24 h míchat v uzavřené nádobě.

Ředění zásobních roztoků probíhalo vždy až po dokonalém rozpuštění hyaluronanu. Opět bylo jak množství ředěného zásobního roztoku, tak přidávané vody váženo. Takto namíchané roztoky byly ponechány opět jeden den míchat v uzavřených nádobách, aby bylo dosaženo rovnoměrného zastoupení hyaluronanu v celém roztoku. Pokud nebylo možné roztoky ihned změřit, byly ponechávány v ledničce při teplotě do 5°C a to po dobu maximálně jednoho týdne.

Obdobně jako v případě vodných roztoků se postupovalo i v případě roztoků připravovaných v prostředí 0,15 M chloridu sodného rozpuštěného ve vodě.

Jednotlivé koncentrační řady se ve svém koncentračním rozsahu lišily v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Vždy bylo vybíráno takové hmotnostní zastoupení hyaluronanu v roztoku, aby roztok nebyl příliš viskózní a dobře se s ním pracovalo. Ve vodě byly připraveny všechny koncentrace uvedené v *Tabulkách X1 až X5 v příloze*, v zásobním roztoku chloridu sodného byly připravovány koncentrační řady pouze vybraných molekulových hmotností hyaluronanu. Konkrétně se jedná o hmotnost 117 kDa a 1669 kDa.

3.2.3 Příprava zásobního roztoku karagenanu

Zásobní roztoky karagenanu o koncentraci 0,3 % a 0,15 % byly připraveny přímým rozpouštěním karagenanu v ultra čisté deionizované vodě z přístroje PURELAB. Všechny komponenty roztoku byly váženy. Před použitím byl roztok ponechán 24 h míchat v uzavřené nádobě.

3.3 Měření ultrazvukové rychlosti

K měření připravených vzorků byl použit přístroj HRUS 102, od firmy Ultrasonic Scientific, Irsko. Vzorky byly měřeny při šesti frekvencích v rozsahu 2740 – 14 815 kHz. Jednotlivé frekvence, na kterých probíhalo měření, jsou charakterizovány číslem píku. Platí, že každý pík má své číslo, takzvané harmonické číslo, které může být spočítáno podělením frekvence píku rozdílem frekvencí dvou sousedních píků. Čísla píků, při kterých probíhalo měření, jsou 23, 42, 65, 94, 99 a 120. Pro získání správných výsledků platí, že číslo píku vzorku i referenčního média musí být stejné. Jednotlivé vzorky byly měřeny proti rozpouštědлу, tedy vodě, a to i v případě měření roztoků připravovaných rozpouštěním hyaluronanu v roztoku chloridu sodného. Měření byla prováděna jako komparativní [17]. Měření probíhalo současně jednak v referenční cele obsahující čisté disperzní prostředí a zároveň v měřicí cele obsahující zkoumaný vzorek. Do přístroje bylo aplikováno vždy po

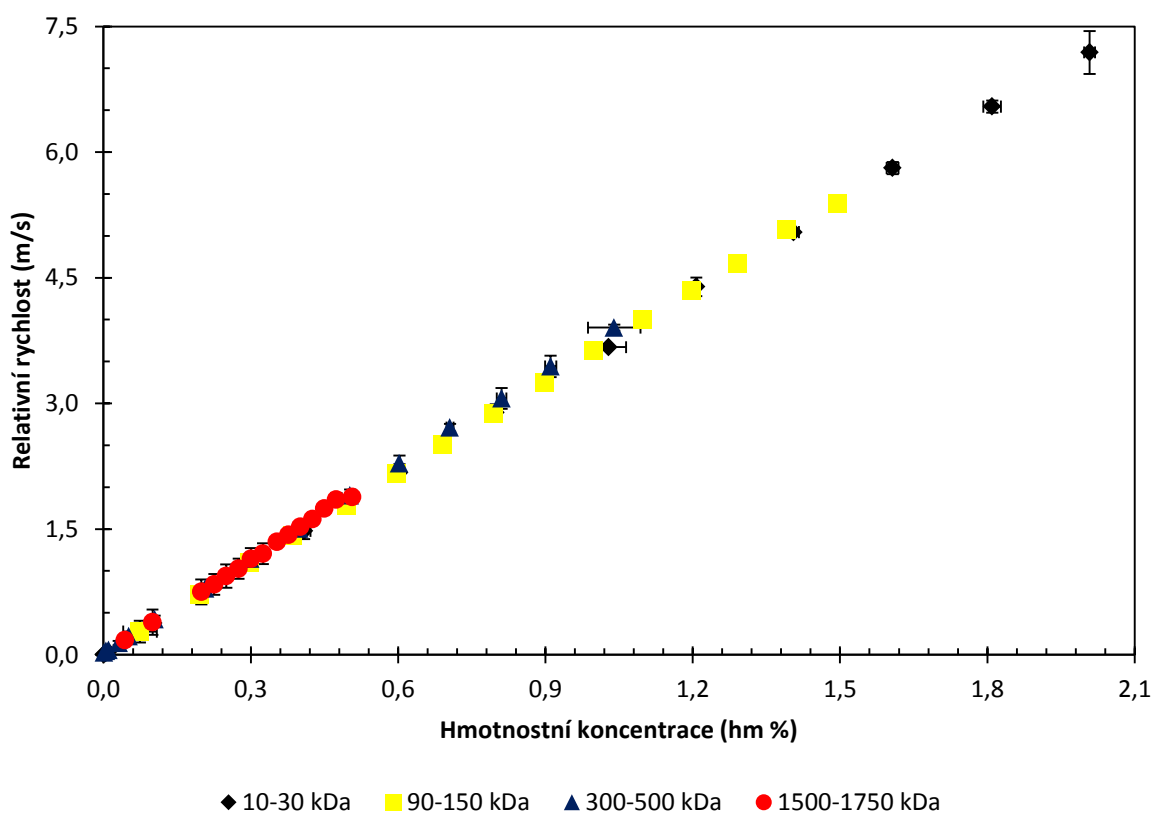
jednom mililitru odplyněného vzorku. Odplynění bylo prováděno na centrifuze při 3000 ot/min po dobu 5 minut.

Přístroj HRUS 102 umožňuje provádět měření v kinetickém, titračním nebo teplotním režimu a existují i detektory napojitelné na výstup z HPLC [17]. V experimentální části této práce byly aplikovány dva typy měření a to kinetické, tedy za konstantní teploty 25 °C, kdy byly proměřeny všechny vzorky koncentrační řady, a měření v teplotním režimu. Při tomto typu měření byla teplota měněna v rozsahu 25 – 70 °C rychlostí 1 °C za 5 minut s krokem 0,01 °C u vybraných koncentrací, jak ukazuje **Tabulka XI v příloze**. Z obou druhů měření byly zaznamenávány hodnoty ultrazvukové rychlosti a zeslabení. Vyhodnocována však byla pouze data ultrazvukové rychlosti, neboť u zeslabení nebyl nalezen žádný pozorovatelný trend.

3.4 Vyhodnocení dat a diskuze

3.4.1 Hyaluronan a jeho vlastnosti

3.4.1.1 Ultrazvuková rychlost při 25 °C



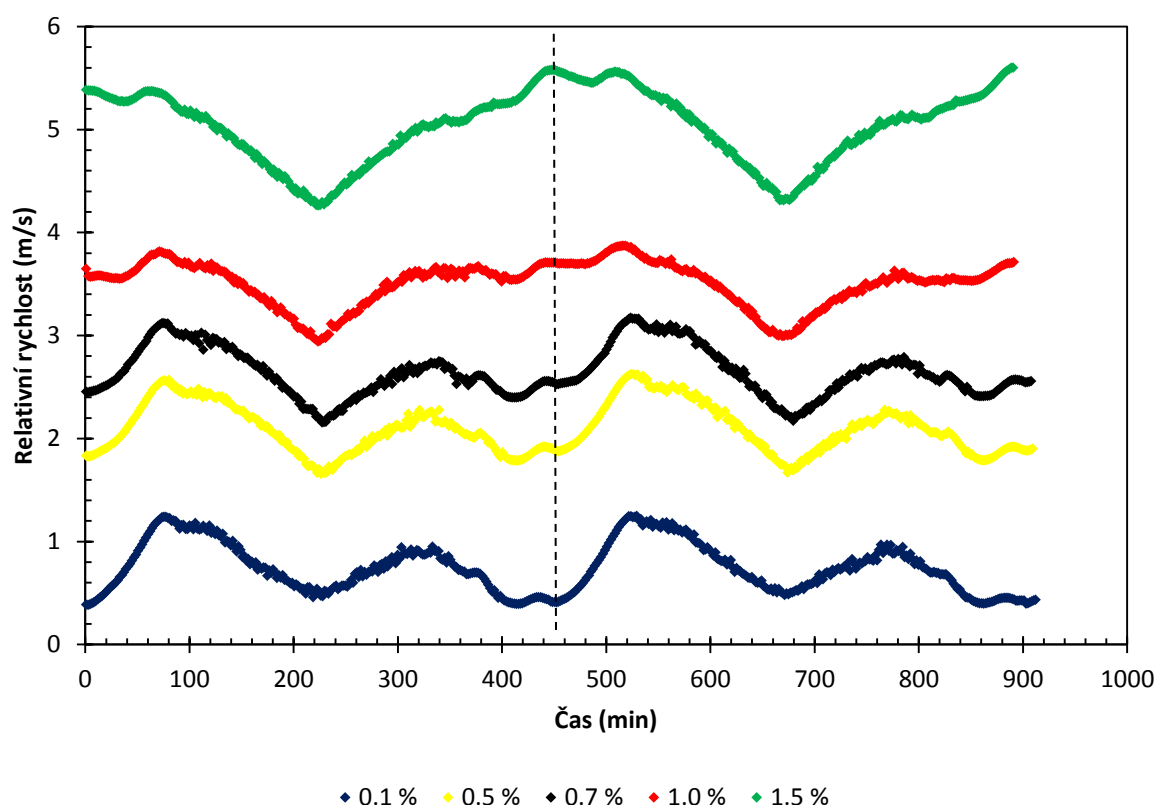
Obrázek 10: Graf znázorňující velikosti relativní ultrazvukové rychlosti v závislosti na koncentraci roztoku a molekulové hmotnosti hyaluronanu. (11,6 MHz, 25°C)

Naměřená data (**Obrázek 10**) popisují závislost relativní rychlosti ultrazvukové vlny procházející vzorkem (tedy rychlosti zvuku ve vzorku, od které je odečtena rychlost zvuku ve srovnávací cele) v závislosti na jeho koncentraci, při všech měřených koncentračních řadách. Výsledkem je pro každou koncentrační řadu lineární závislost. Tato závislost je průměrem opakovaného měření koncentračních řad hyaluronanu. Graf na **Obrázku 10** zároveň ukazuje, že velikost relativní rychlosti nezáleží na molekulové hmotnosti hyaluronanu, ale pouze na koncentraci hyaluronanu v roztoku. Při zvyšování koncentrace dochází k lineárnímu nárůstu relativní rychlosti u všech měřených molekulových hmotností hyaluronanu. Proložení všech bodů společnou přímkou získáme rovnici $y = 3,601 \cdot x + 0,042$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,9997$. Tato závislost byla získána pomocí programu QC Expert 3.3 software (TriloByte, Czech Republic).

Graf (**Obrázek 10**) znázorňuje průměr hodnot z naměřených koncentračních řad při frekvenci 11,6 MHz. Všechny naměřené hodnoty, jejich průměry a směrodatné odchylky jsou znázorněny v **Tabulce X2 až X5 v příloze**. Rozdíly mezi jednotlivými měřeními jsou znázorněny chybovými úsečkami a to jak v souřadnicích relativní rychlosti, tak v souřadnicích hmotnostní koncentrace. Z grafu je patrné, že měření je zatíženo poměrně malou chybou. Největší směrodatná odchylka parametru koncentrace je 0,0534 hm %, největší směrodatná odchylka parametru relativní rychlosti je 0,25 m/s.

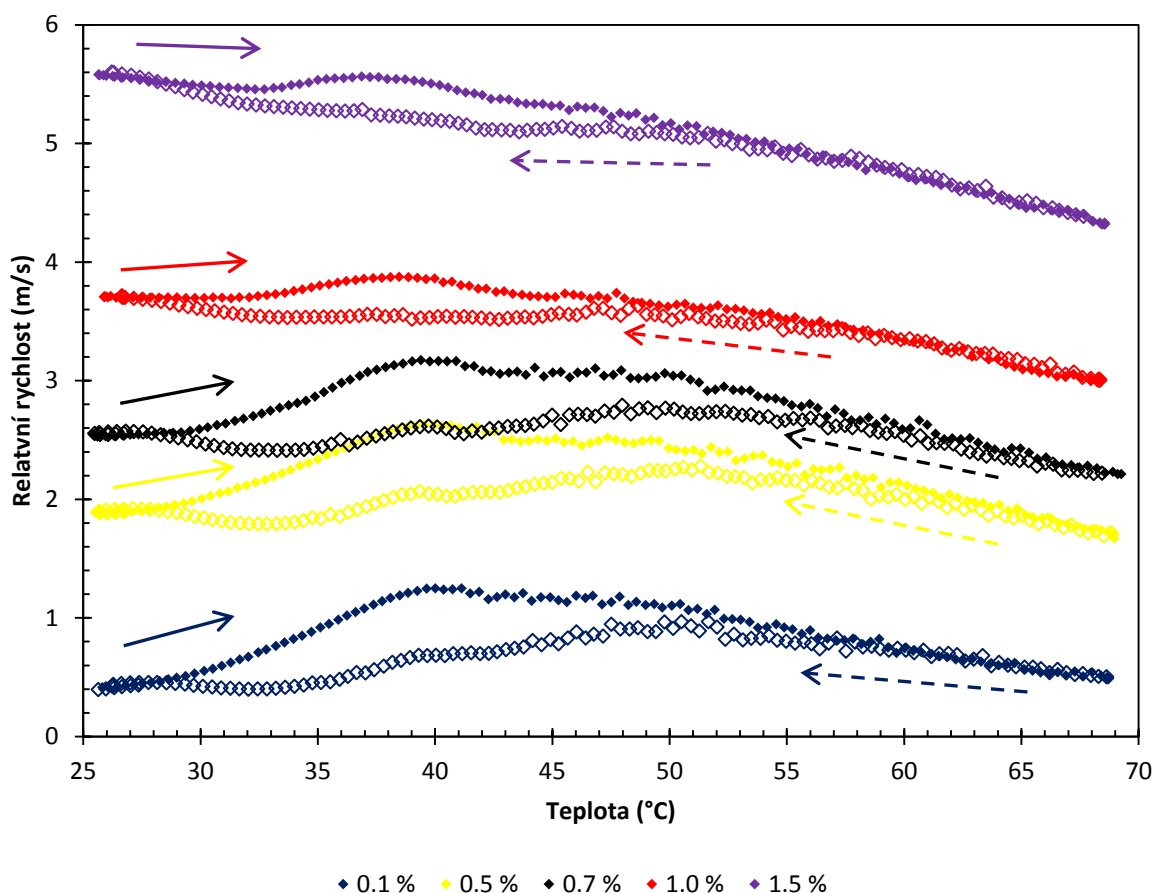
Protože výsledná závislost nezáleží na frekvenci, při které je vzorek měřen, jsou uváděny pouze výsledky z měření při frekvenci 11,6 MHz

3.4.1.2 Teplotní závislosti



Obrázek 11: Graf znázorňující relativní rychlosti ultrazvukové vlny procházející roztoky 90 – 130 kDa hyaluronanu ve vodě v závislosti na čase při dvou po sobě jdoucích cyklech teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C, při různých koncentracích hyaluronanu)

Data z grafu (**Obrázek 11**) ukazují vybrané koncentrace z koncentrační řady 90 – 130 kDa hyaluronanu rozpuštěného ve vodě, konkrétně 0,1%, 0,5%, 0,7%, 1,0% a 1,5%. Jedná se o závislosti relativní rychlosti na čase. Z grafu je patrné, že relativní rychlost v roztoku záleží, jak bylo zmíněno v kapitole 3.4.1.1., na koncentraci hyaluronanu v roztoku, se kterou relativní rychlost lineárně vzrůstá. Stejně jako v případě kapitoly 3.4.1.1. není ani zde potřeba uvádět výsledky ze všech měřených frekvencí, neboť si vzájemně odpovídají, z toho důvodu je znázorněna pouze ukázka měření při frekvenci 11,6 MHz. Výsledky z měření ostatních molekulových hmotností hyaluronanu jsou znázorněny na **Obrázcích XI** a **X2** v příloze.



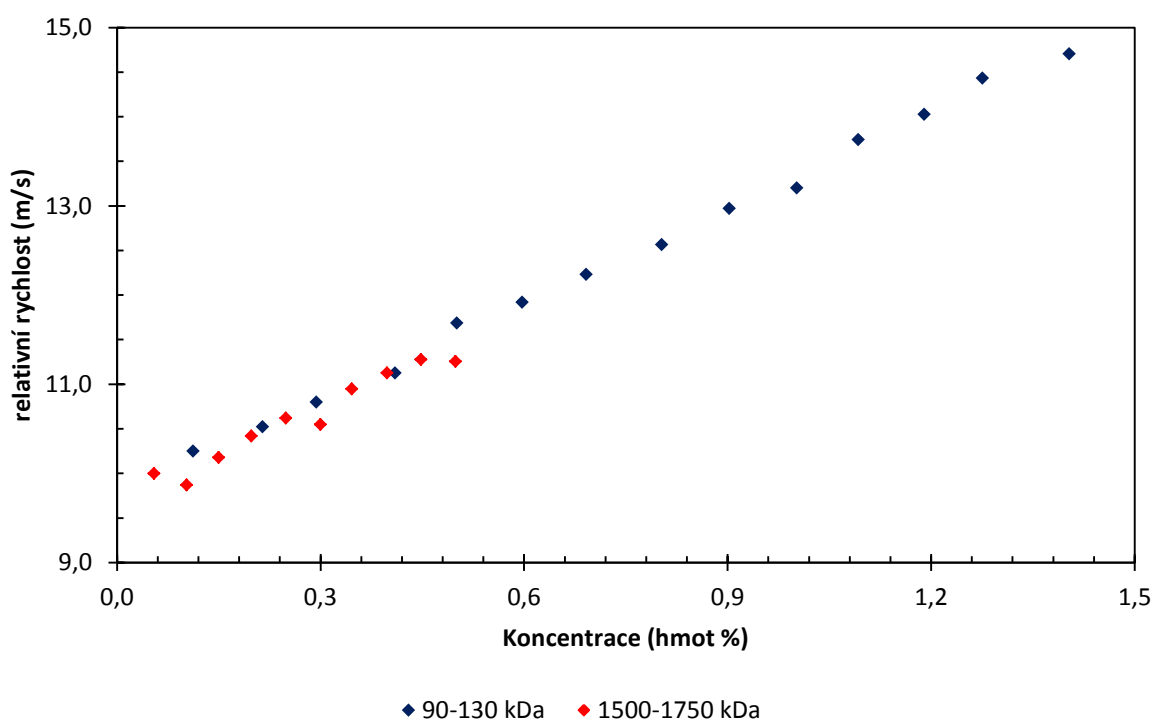
Obrázek 12: Graf znázorňující relativní rychlosti zvukové vlny procházející roztoky 90 – 130 kDa hyaluronanu ve vodě v závislosti na teplotě při jednom cyklu teplotního programu (11,6 MHz, 25 – 70 °C a zpět, při různých koncentracích hyaluronanu).

Data grafu (**Obrázek 12**) ukazují závislost relativní rychlosti na teplotě. Jedná se o stejné koncentrace, které znázorňuje graf na **Obrázku 11**. Do grafu je na rozdíl od předchozího vyobrazení zahrnut pouze jeden cyklus teplotního skenu, tedy 25 – 70 °C a zpět. Z grafu je dobře patrné, že všechny vzorky nezávisle na koncentraci jsou termostabilní, neboť při návratu na výchozí hodnotu 25 °C je hodnota ultrazvukové rychlosti shodná s výchozí hodnotou měření. Termostabilitu vzorků je možné pozorovat i v grafu na **Obrázku 11**, přestože vzorek prochází dvěma teplotními programy, kdy přibližně v 450. minutě dochází k ukončení prvního cyklu a začátku druhého (označeno pomocí čárkované čáry), lze v této hodnotě pozorovat v podstatě počátek identického záznamu hodnot, jaké byly zaznamenány během prvního cyklu. Data grafu zároveň ukazují rozdílné hodnoty relativní rychlosti při stejné teplotě v závislosti na fázi teplotního cyklu. Při zahřívání vzorku je ultrazvuková rychlost vyšší a znázorňují ji plné značky, zatímco při ochlazování (prázdné značky) je relativní rychlost nižší. Tento efekt je platný nezávisle na molekulové hmotnosti, jak dokazují

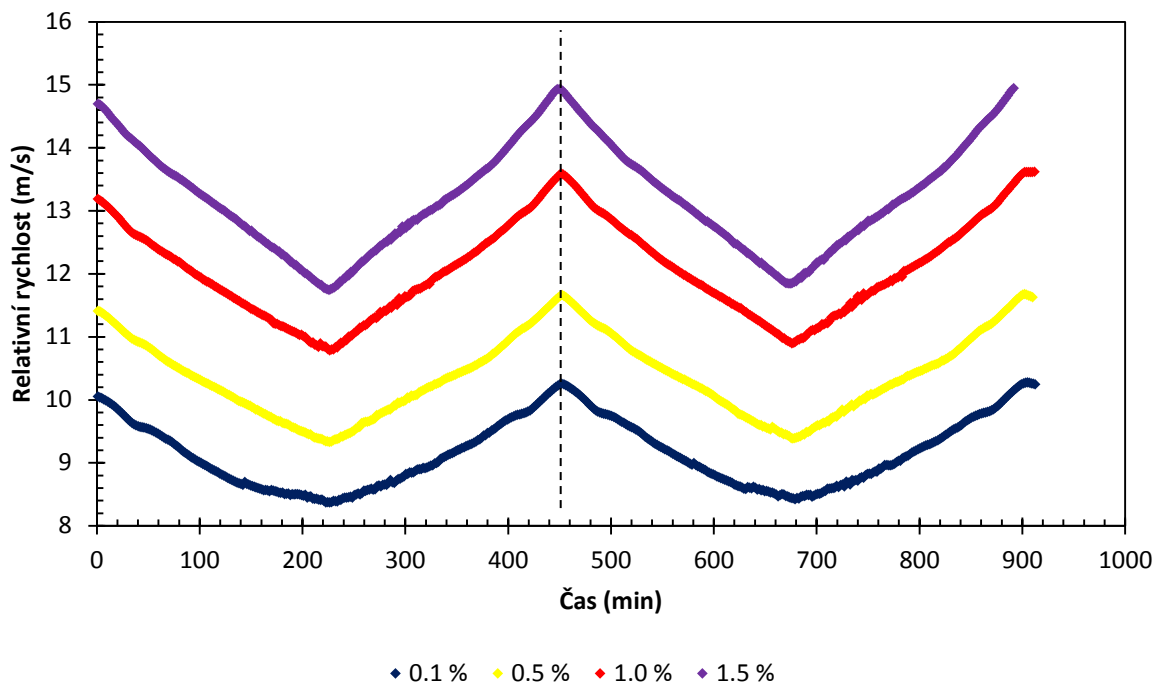
grafy na **Obrázcích X3 a X4 v příloze**. Velikost takto vzniklého „oka“ (tzv. hystereze) v průběhu teplotního cyklu je přibližně 0,5 m/s nezávisle na koncentraci nebo molekulové hmotnosti hyaluronanu. Z grafu je rovněž patrné, že relativní rychlost dosahuje při zahřívání vzorku svého maxima už při 40 °C a s rostoucí teplotou už pouze klesá spolu s klesající hustotou roztoku při zahřívání, přestože voda má nejvyšší stlačitelnost, tedy nejvyšší rychlost prostupu ultrazvukové vlny, při 64 °C [8]. Tento jev je rovněž platný nezávisle na molekulové hmotnosti nebo koncentraci hyaluronanu. Je možné usoudit, že ve vodných roztocích hyaluronanu došlo k posunu maximální hodnoty stlačitelnosti vody z 64 °C na nižší hodnotu, přibližně 40 °C. Výsledky dalších molekulových hmotností, tedy 10 – 30 kDa a 1500 – 1750 kDa, jsou uvedeny v grafech na **Obrázcích X3 a X4 v příloze**.

Protože výsledné závislosti nezáleží na frekvenci, při které je vzorek měřen, jsou uváděny pouze výsledky z měření na frekvenci 11,6 MHz.

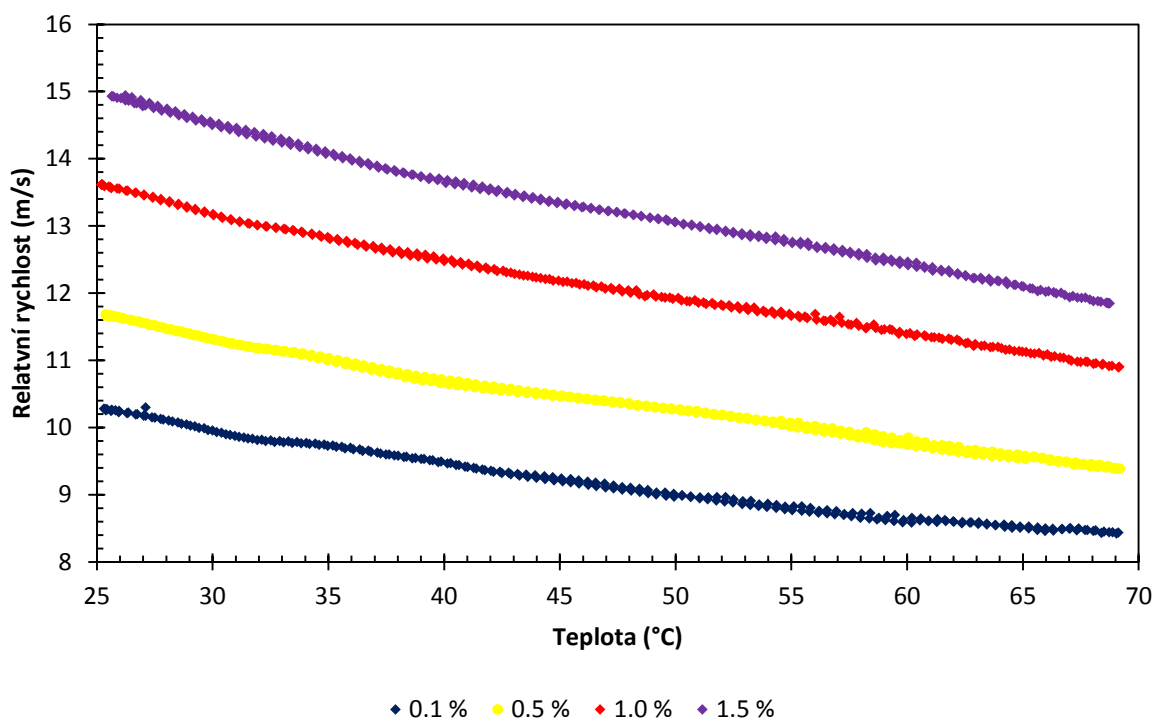
3.4.1.3 Vliv chloridu sodného



Obrázek 13: Graf znázorňující velikosti relativní ultrazvukové rychlosti v závislosti na koncentraci roztoku a molekulové hmotnosti hyaluronanu v prostředí 0,15 M chloridu sodného (11,6 MHz, 25°C).



Obrázek 14: Graf znázorňující relativní rychlosti ultrazvukové vlny procházející roztoky 90 – 130 kDa hyaluronanu v prostředí 0,15 M chloridu sodného v závislosti na čase při dvou po sobě jdoucích cyklech teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C, při různých koncentracích hyaluronanu)



Obrázek 15: Graf znázorňující relativní rychlosti ultrazvukové vlny procházející roztoky 90 – 130 kDa hyaluronanu v prostředí 0,15 M chloridu sodného v závislosti na teplotě při jednom cyklu teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C)

Grafy (**Obrázky 13, 14, 15, X5 a X6 v příloze**) vykazují posun k vyšším relativním rychlostem ve srovnání s vodným prostředím. Tento posun je zapříčiněn vyšší hustotou měřených vzorků. Zároveň také toto měření dokládá, že i přes prostředí 0,15 M chloridu sodného zůstává zachována platnost lineární závislosti na koncentraci bez ohledu na molekulovou hmotnost hyaluronanu, jak ukazuje graf (**Obrázek 13**). Tato závislost ovšem není zdaleka tak ideální jako lineární závislost ve vodných roztocích, především u vysokomolekulárního hyaluronanu. Proložením všech bodů společnou přímkou získáme rovnici $y = 3,514 \cdot x + 9,760$ s vícenásobným korelačním koeficientem $R = 0,9951$. Tato závislost byla získána pomocí programu QC Expert 3.3 software (TriloByte, Czech Republic).

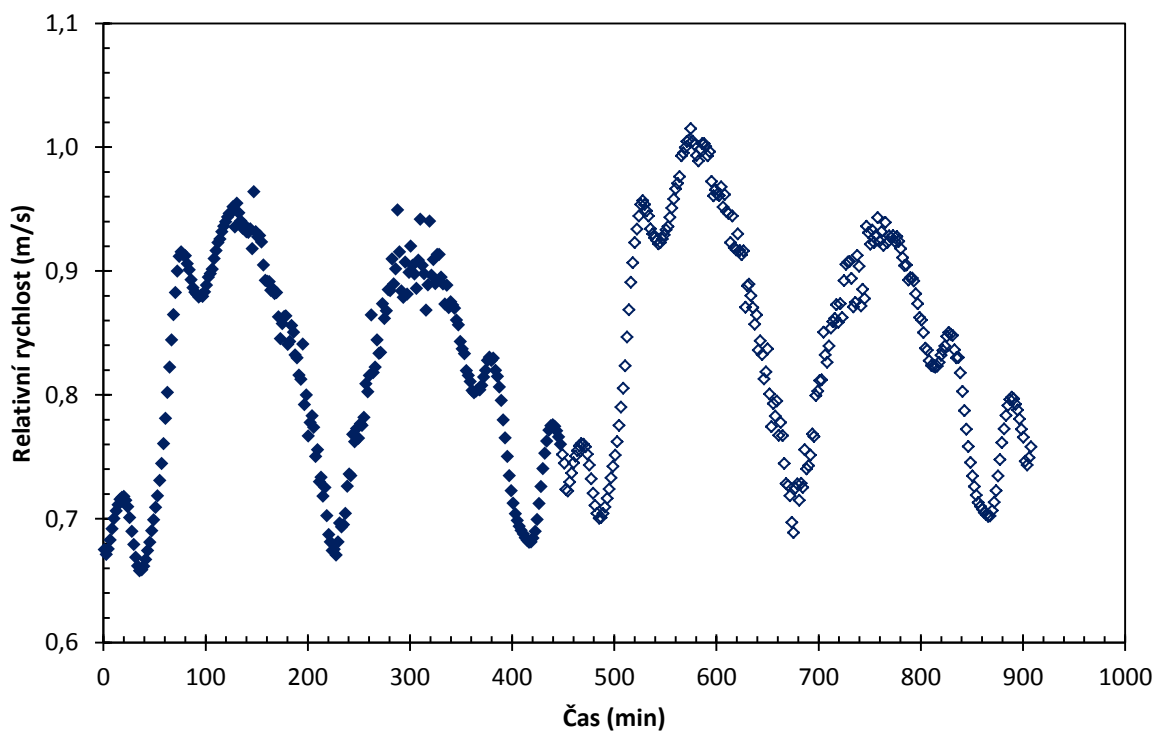
Data grafů na **Obrázcích 14 a 15**, které znázorňují chování 90 – 130 kDa hyaluronanu v závislosti na teplotě, kromě posunu k vyšším relativním rychlostem ukazují, že s rostoucí teplotou vzorku lineárně klesá velikost ultrazvukové rychlosti, naopak při vzrůstající teplotě vzorku rychlost lineárně narůstá. Tato závislost však není platná v případě roztoků 1500 – 1750 kDa hyaluronanu, kde je z grafu (**Obrázek X6 v příloze**) patrné, že při ochlazování roztoku na původní hodnotu (prázdné značky) nedochází k návratu relativní rychlosti do původních hodnot, ale hodnoty relativní rychlosti jsou u všech měřených koncentrací trochu vyšší.

Ve vodném prostředí, na rozdíl od prostředí chloridu sodného, nedochází k poklesu relativní rychlosti u v průběhu teplotního programu. Jak ukazuje graf (**Obrázek 12**) počáteční hodnota při 25 °C a konečná hodnota při 70 °C si téměř odpovídají, na rozdíl od grafů na **Obrázcích 15 a X6**, kde rozdíl relativní rychlosti mezi počáteční a konečnou teplotou je téměř 2 m/s.

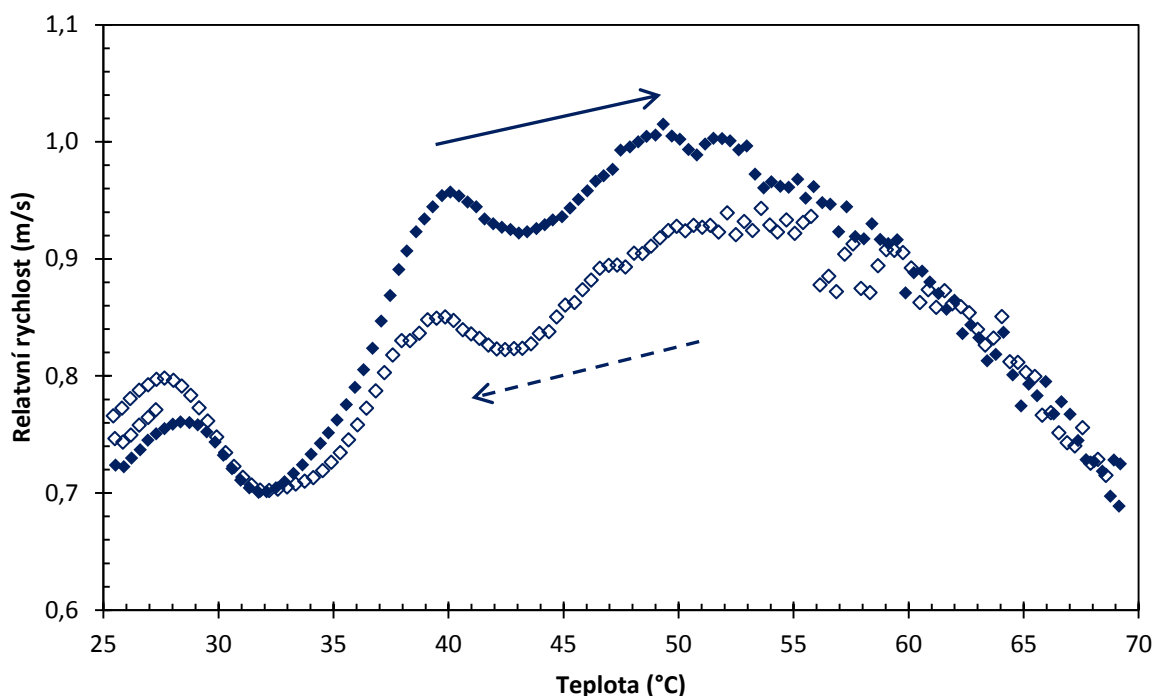
V prostředí chloridu sodného velikost ultrazvukové rychlosti u nízkomolekulárního hyaluronanu závisí pouze na hustotě. Nedochází zde k podobným jevům, jako tomu bylo v případě vodných roztoků, kde se naměřená data liší v závislosti na ohřívání či chlazení vzorku. Toto měření ukazuje na tepelnou stabilitu nízkomolekulárního hyaluronanu mnohem více než měření v prostředí vody, neboť ve vodném prostředí byly shodné pouze počátky a konce teplotních programů (graf na **Obrázku 12**). U jistých koncentrací vysokomolekulárního hyaluronanu (0,3 % a 0,5 %) jak ukazuje graf na **Obrázku X6 v příloze** však dochází k tvorbě podobných „ok“ jako ve vodném prostředí i v přibližně stejné teplotě 40 °C, přestože oka ve vodném prostředí a v prostředí chloridu sodného nemají stejný charakter. V prostředí chloridu sodného je oko vytvořeno na přímce při neustálém poklesu relativní rychlosti, kdežto ve vodném prostředí je oko vytvořeno zvyšující se velikostí relativní rychlosti.

Protože výsledné závislosti nezáleží na frekvenci, při které je vzorek měřen, jsou uváděny pouze výsledky z měření na frekvenci 11,6 MHz.

3.4.2 Karagenan a jeho vlastnosti



Obrázek 16: Graf znázorňující relativní rychlosti ultrazvukové vlny procházející roztokem κ – karagenanu ve vodném prostředí v závislosti na čase při dvou po sobě jdoucích cyklech teplotního programu. (0,3 %, 11,6 MHz, 25 – 70 °C)



Obrázek 17: Graf znázorňující relativní rychlosti ultrazvukové vlny procházející roztokem κ – karagenanu ve vodném prostředí v závislosti na teplotě při jednom cyklu teplotního programu. (0,3 %, 11,6 MHz, 25 – 70 °C)

Protože data z měření vlastností karagenanu slouží jako porovnání k datům hyaluronanu, tyto výsledky měření (grafy na **Obrázcích 16 a 17**) by měly ukázat na změny ve struktuře karagenanu v roztoku v závislosti na teplotě, popsané v literatuře. Změna konformace karagenanu ve vodném roztoku by měla nastat přibližně při teplotě kolem 38 °C, jedná se o teplotu přechodu mezi šroubovicí a náhodným klubkem při zahřívání roztoku, naopak při ochlazování dochází k přechodu z náhodného klubka na šroubovici [5].

Z grafu (**Obrázek 17**) je patrné, že při teplotě přibližně 40 °C dochází při zvyšování teploty ke krátkodobému poklesu velikosti ultrazvukové rychlosti. Teplota této změny je pro zahřívání (plné značky) i ochlazování (prázdné značky) stejná, je tedy pravděpodobné, že se jedná právě o teplotu, kdy se začíná měnit konformace karagenanu.

Společná vlastnost s vodnými roztoky hyaluronanu je tvorba „ok“ během teplotního programu, kdy při zahřívání je velikost relativní rychlosti při stejné teplotě vyšší než při ochlazování (graf na **Obrázku 17**). Celý záznam velikosti relativní rychlosti v závislosti na teplotě je však mnohem více členitý než v případě roztoků hyaluronanu, kde při zahřívání i ochlazování byl celý záznam pouze s jedním zlomem a relativní rychlost v první části zahřívání, přibližně do 40 °C pouze stoupala, ve druhé části naopak pouze klesala. Roztok karagenanu oproti tomu klesá a stoupá do 50 °C několikrát.

4 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo seznámit se s metodou ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a jejím využitím v koloidní chemii. Na základě literárních poznatků měla být navrhována vhodná metodika pro sledování ultrazvukových parametrů roztoků hyaluronanu při různých koncentracích a teplotách. V této bakalářské práci byla sledována relativní ultrazvuková rychlost ve vodném a fyziologickém roztoku hyaluronanu.

Sledování ultrazvukových vlastností roztoků probíhalo dvěma způsoby. Nejprve pomocí koncentračních řad, kde byly proměřeny všechny molekulové hmotnosti (10 – 30 kDa, 90 – 130 kDa, 300 – 500 kDa a 1500 – 1750 kDa), každá z nich v jiném koncentračním rozsahu. Měření probíhalo v kinetickém módu, tedy za konstantní teploty 25 °C. Bylo zjištěno, že všechny koncentrační řady mají lineární závislost. Zároveň bylo zjištěno, že velikost relativní rychlosti nezáleží na molekulové hmotnosti hyaluronanu, ale pouze na jeho koncentraci ve vzorku. Rozhodující pro velikost relativní rychlosti je tedy počet dimerů D – glukuronové kyseliny a N – acetyl – D – glukosaminu, které se nachází v roztoku, nikoliv počet těchto dimerů v řetězci. Stejně lineární závislosti byly naměřeny jak ve vodném, tak ve fyziologickém prostředí 0,15 M chloridu sodného, u něhož však byly posunuty do vyšších hodnot relativní rychlosti z důvodů vyšší hustoty samotného fyziologického roztoku. Bylo zjištěno, že ve fyziologickém prostředí má tato lineární závislost nižší směrnici lineární regrese přibližně o $0,09 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{hm}\%^{-1}$.

Druhý způsob byl založen na měření v teplotním režimu, kde byla teplota měněna v rozsahu 25 – 70 °C. Měření probíhalo u vybraných koncentrací ve vodném i fyziologickém roztoku. Bylo zjištěno, že v obou případech hodnoty ultrazvukové rychlosti při dvou po sobě jdoucích cyklech teplotního programu (zahřívání na 70 °C a následné chlazení probíhalo při každém měření dvakrát po sobě), mají stejnou velikost. Toto zjištění ukazuje na tepelnou stabilitu roztoků hyaluronanu. Ve vodném prostředí však, na rozdíl od prostředí chloridu sodného, nebyla relativní rychlost při zahřívání stejná jako při ochlazování. Během každého teplotního cyklu docházelo ke tvorbě „ok“ (tzv. hysterezi). Zajímavé ale je, že se hodnoty relativní rychlosti během ochlazování, při přibližování k výchozím a koncovým hodnotám teploty, vždy vrátily k hodnotám naměřených během zvyšování teploty. Tento návrat k již naměřeným teplotám rovněž ukazuje na nezměněné vlastnosti vzorku po zahřívání. U měření vlastností fyziologických roztoků byla tvorba podobných „ok“ zaznamenána pouze u vysokomolekulárního hyaluronanu a pouze u koncentrací 0,3 % a 0,5 %. Toto teplotní

chování dosud nebylo u hyaluronanu popsáno, a jistě si zaslouží podrobnější prozkoumání a objasnění jeho příčin. Vzhledem k tomu, že bylo pozorováno v oblasti fyziologicky významných teplot, měla by se při zkoumání těchto příčin věnovat i pozornost možnému dopadu na funkci hyaluronanu v živých organismech.

K porovnání hodnot získaných měřením vlastností roztoků hyaluronanu byl využit vodný roztok karagenanu o koncentraci 0,3 %. U tohoto roztoku byla předpokládaná změna vlastností relativní rychlosti v závislosti na teplotě očekávána přibližně při 38 °C [5]. Tento předpoklad byl splněn a karagenan tak splnil svojí úlohu jakožto srovnávací polymer. Ukázalo se však, že roztok karagenanu je mnohem složitější než roztoky hyaluronanu, neboť mimo očekávané změny při 40 °C byla zjištěna řada dalších zlomů při sledování relativní rychlosti v závislosti na teplotě.

Získané výsledky měření vlastností roztoků hyaluronanu by mohly najít uplatnění při použití hyaluronanu jako nosiče léčiv, neboť na základě získaných dat je možné říci, že při aplikaci do organismu a následné nevyhnutelné změně teploty, nezávisle na koncentraci nebo molekulové hmotnosti, nedojde k žádné změně struktury hyaluronanu.

V této bakalářské práci bylo úspěšně dosaženo všech předepsaných cílů. Bylo změřeno a popsáno chování roztoků hyaluronanu za různých podmínek. Cílem další práce by mohlo být detailnější zkoumání vlastností karagenanu. Jak se ukázalo, karagenan je svým chováním daleko složitější než hyaluronan a jistě by si podrobnější zkoumání zasloužil. Taktéž by si další zkoumání jistě zasloužil hyaluronan, především díky nově zjištěnému teplotnímu chování.

5 CITACE

- [1] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007, vol. 64, issue 13, s. 1591-1596.
- [2] HAXAIRE, K., I. BRACCINI, M. MILAS, M. RINAUDO a S. PEREZ. Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling. *Glycobiology*. 2000-06-01, vol. 10, issue 6, s. 587-594.
- [3] HASCALL, Vincent a Torvard LAURENT. Hyaluronan structure and physical properties. *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2014-03-04]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [4] SCOTT, John E. a Frank HEATLEY. Biological properties of hyaluronan in aqueous Solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy: an introduction. *Biomacromolecules*. 2002, vol. 3, issue 3, s. 547-553.
- [5] *Biopolymers*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 636 s. ISBN 35-273-0227-1.
- [6] HARGITTAI, István, Magdolna HARGITTAI, M. MILAS, M. RINAUDO a S. PEREZ. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, vol. 19, issue 5, s. 697-717.
- [7] SCOTT, John E. *Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some biological consequences*. [online]. 1998 [cit. 2014-03-05]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [8] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers*. 2014, vol. 106, s. 453-459.
- [9] DENNINGER, Philipp a Oliver REISER. Hyaluronic acid: The Secret of young skin. *Chemistry in context* [online]. 2008 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z: <http://www.chemistry-in-context.com/articles/0128/>
- [10] ASARI, Akira a Satoshi MIYAUCHI. Medical application of hyaluronan. *Glycoforum* [online]. 2006 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA13/HA13E.html>
- [11] GIRISH, K.S., K. KEMPARAJU, M. MILAS, M. RINAUDO a S. PEREZ. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences*. 2007, vol. 80, issue 21, s. 1921-1943.
- [12] CORADINI, D., C. PELLIZZARO, G. MIGLIERINI, M.G. DAIDONE a A. PERBELLINI. Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: Improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line. *International journal of cancer*. 1999, vol. 81, issue. 3, s. 411-416.
- [13] ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1972, vol. 24, issue 2. ISSN 00223573.

- [14] DE RUITER, Gerhard A., Brian RUDOLPH, M. MILAS, M. RINAUDO a S. PEREZ. Carrageenan biotechnology: A biological overview. *Trends in Food Science*. 1997, vol. 8, issue 12, s. 389-395.
- [15] MCHUGH, Dennis J. A guide to the seaweed industry. FAO. *FAO fisheries technical paper* [online]. Řím, 2003 [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e00.htm#Contents>
- [16] Introduction: High resolution ultrasonic spectroscopy. *Ultrasonic Scientific: the wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20intro.htm>
- [17] PEKAŘ, M., J. KUČERÍK a D. ŠMEJKALOVÁ. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii. *CHEMagazín*. 2005, roč. 15, č. 1, s. 12-14.
- [18] Principles of the ultrasonic measurement. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20principles.htm>
- [19] The Ultrasonic wave: Direct probing of intermolecular forces. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20US%20wave.htm>
- [20] Ultrasonic velocity. *Ultrasonic Scientific: The wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20velocity.htm>
- [21] Ultrasonic attenuation. *Ultrasonic Scientific: the wave of the future* [online]. 2007 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://www.ultrasonic-scientific.com/Technology/Technology%20-%20attenuation.htm>
- [22] BUCKIN, V., E. KUDRYASHOV a B. O'DRISCOLL. High – resolution ultrasonic spectroscopy for material analysis. *Spectroscopy perspectives*. 2002, č. 28, s. 28-31.
- [23] O'DRISCOLL, B., C. SMYTH, A.C. ALTING, R.W. VISSCHER a V. BUCKIN. Recent applications for high – resolution ultrasonic spectroscopy. *American Laboratory*. 2003, s. 54-57.

Zkratka	Význam
HA	hyaluronan, z anglického hyaluronic acid
koncentrace v %	hmotnostní koncentrace, (podíl hmotnosti složky k hmotnosti rozpouštědla)
hmot %	
hm %	
pH	záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
pK	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty při 25°C
Da	dalton, v biochemii platí $1 \text{ Da} = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
NMR	spektroskopie nukleární magnetické resonance
E 407	kód značící látky povolené pro přidávání do potravin
HIV	retrovirus, z anglického human immunodeficiency virus
M_w	molekulová hmotnost, z anglického molecular weight
M	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
Hz	hertz, jednotka frekvence
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z anglického high performance liquid chromatography

7 PŘÍLOHY

Tabulka X 1: Výpis koncentrací použitých při měření teplotních skenů roztoků hyaluronanu.

Koncentrační řady pro měření teplotních skenů			
Mw kDa	15	117	1669
	2,0	1,5	0,5
Hmotnostní	1,0	1,0	0,3
koncentrace	0,5	0,7	0,1
(hmot %)	0,1	0,5	
		0,1	

Tabulka X 2: Relativní ultrazvuková rychlost hyaluronanu s molekulovou hmotností 10 – 30 kDa ve vodě.

průměr		směrodatné odchylky	
koncentrace	relativní	koncentrace	relativní
(hmot %)	rychlost (m/s)	(hmot %)	rychlost (m/s)
0,0010	0,0012	0,0000	0,0313
0,0049	0,0172	0,0003	0,0263
0,0097	0,0346	0,0004	0,0301
0,0484	0,1795	0,0022	0,0417
0,1017	0,3782	0,0024	0,0164
0,1979	0,7291	0,0053	0,0164
0,4087	1,4771	0,0127	0,0984
0,6027	2,1728	0,0096	0,0999
0,7985	2,8901	0,0047	0,0979
1,0285	3,6714	0,0355	0,0083
1,2073	4,3921	0,0032	0,1117
1,4054	5,0446	0,0105	0,0188
1,6072	5,8098	0,0121	0,0719
1,8099	6,5437	0,0180	0,0732
2,0082	7,1899	0,0113	0,2555

Tabulka X 3: Relativní ultrazvuková rychlost hyaluronanu s molekulovou hmotností 90 – 150 kDa ve vodě.

průměr		směrodatné odchylky	
koncentrace	relativní	koncentrace	relativní
(hmot %)	rychlost (m/s)	(hmot %)	rychlost (m/s)
0,0741	0,2756	0,0343	0,1308
0,1965	0,7194	0,0027	0,0090
0,2975	1,0954	0,0021	0,0028
0,3853	1,4178	0,0028	0,0051
0,4957	1,7767	0,0019	0,0207
0,5974	2,1640	0,0011	0,0003
0,6914	2,5114	0,0116	0,0220
0,7954	2,8734	0,0068	0,0141
0,8989	3,2497	0,0026	0,0078
0,9976	3,6297	0,0018	0,0000
1,0980	4,0021	0,0004	0,0257
1,1971	4,3432	0,0008	0,0724
1,2906	4,6669	0,0051	0,0455
1,3903	5,0694	0,0061	0,0133
1,4949	5,3823	0,0001	0,0047

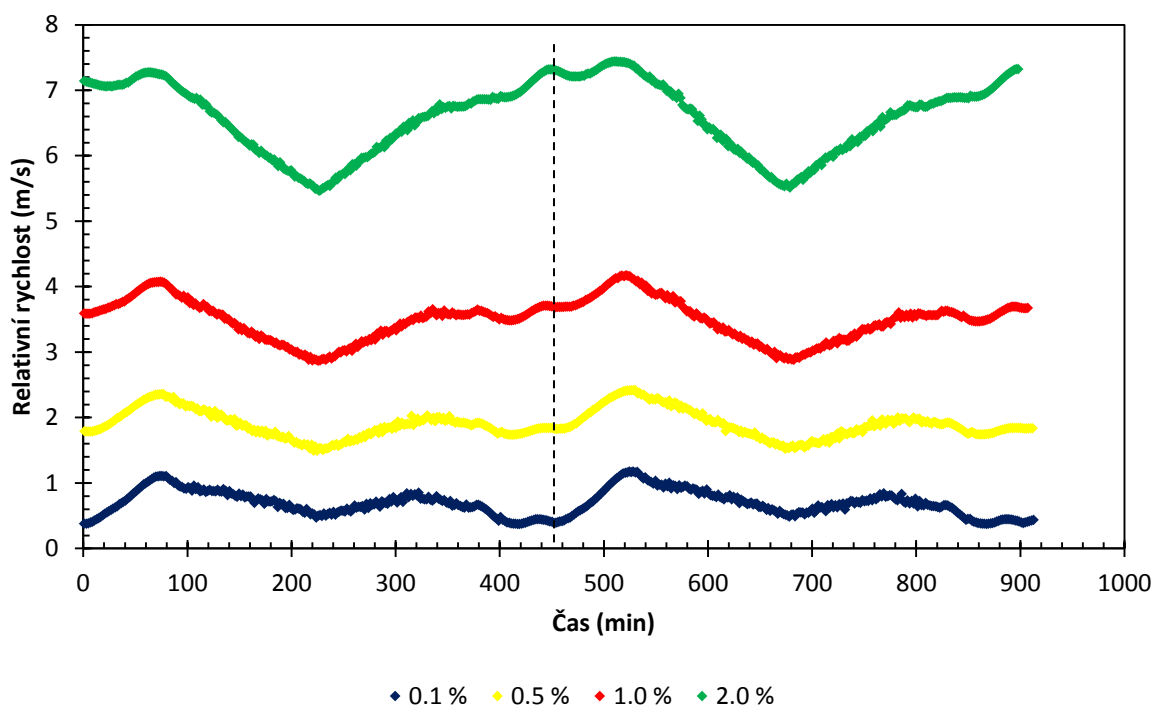
Tabulka X 4: Relativní ultrazvuková rychlost hyaluronanu s molekulovou hmotností 300 – 500 kDa ve vodě.

průměr		směrodatné odchylky	
koncentrace	relativní	koncentrace	relativní
(hmot %)	rychlost (m/s)	(hmot %)	rychlost (m/s)
0,0011	0,0263	0,0000	0,0028
0,0051	0,0430	0,0001	0,0076
0,0104	0,0566	0,0001	0,0165
0,0310	0,1392	0,0004	0,0256
0,0512	0,2199	0,0007	0,0378
0,1041	0,4222	0,0011	0,0435

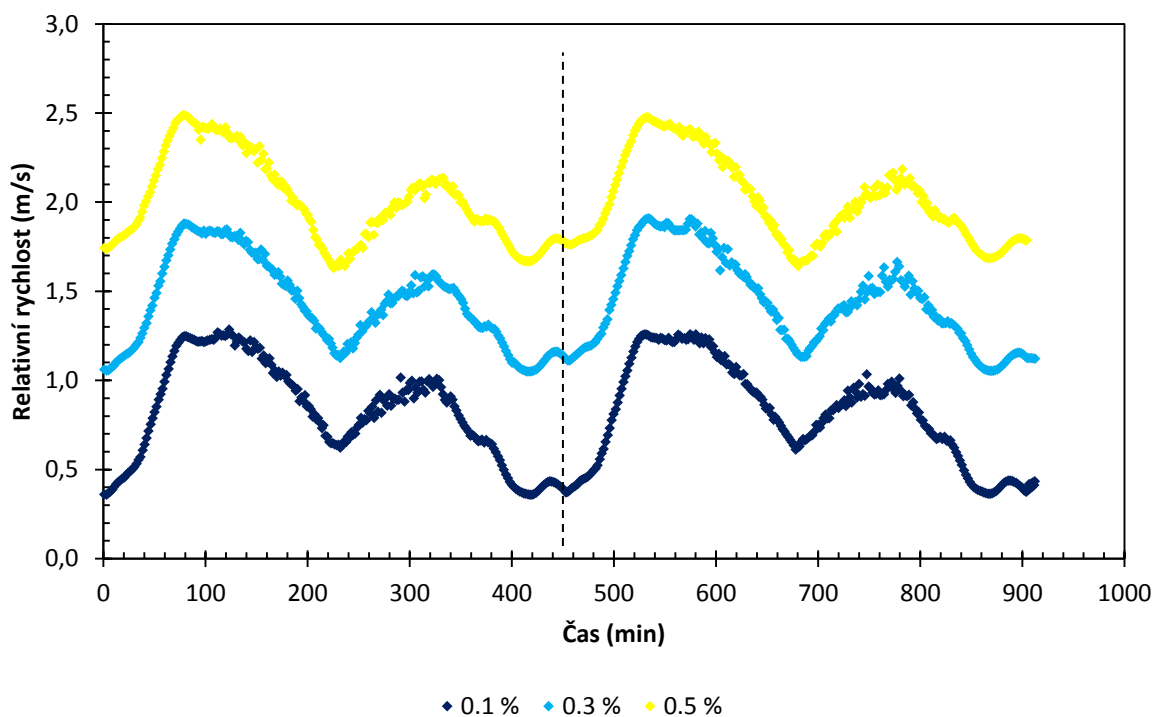
0,2073	0,7896	0,0049	0,0570
0,2991	1,1454	0,0043	0,0460
0,3991	1,5035	0,0018	0,0614
0,5022	1,9021	0,0059	0,0683
0,6027	2,2845	0,0013	0,0921
0,7057	2,7108	0,0070	0,0468
0,8107	3,0597	0,0096	0,1237
0,9104	3,4423	0,0114	0,1272
1,0400	3,9047	0,0534	0,0357

Tabulka X 5: Relativní ultrazvuková rychlost hyaluronanu s molekulovou hmotností 1500 – 1750 kDa ve vodě.

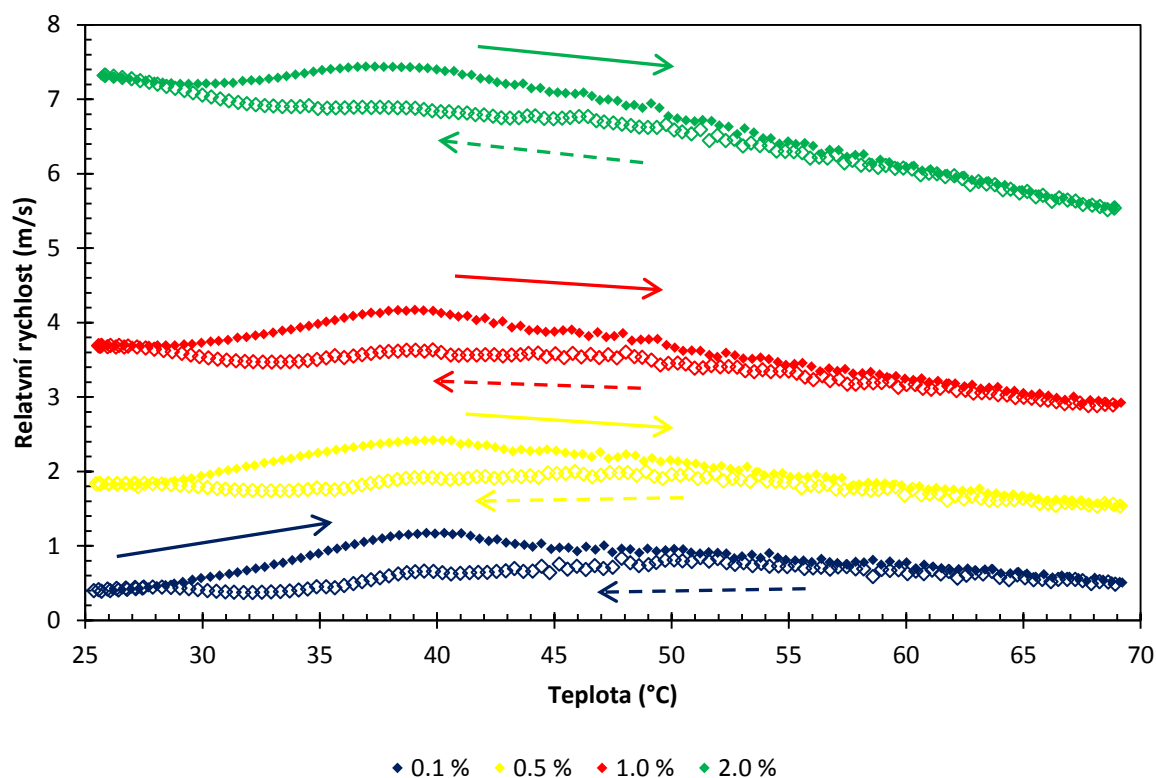
průměr		směrodatné odchylky	
koncentrace	relativní	koncentrace	relativní
(hmot %)	rychlost (m/s)	(hmot %)	rychlost (m/s)
0,0437	0,1742	0,0103	0,0064
0,0998	0,3879	0,0009	0,1522
0,1993	0,7511	0,0009	0,1489
0,2255	0,8390	0,0009	0,1245
0,2500	0,9384	0,0015	0,1382
0,2750	1,0270	0,0022	0,1213
0,3004	1,1453	0,0002	0,1287
0,3247	1,2059	0,0006	0,1225
0,3537	1,3486	0,0051	0,0422
0,3769	1,4308	0,0030	0,0592
0,4012	1,5288	0,0042	0,0643
0,4256	1,6204	0,0019	0,0654
0,4499	1,7434	0,0003	0,0665
0,4741	1,8517	0,0006	0,0778
0,5069	1,8834	0,0094	0,0403



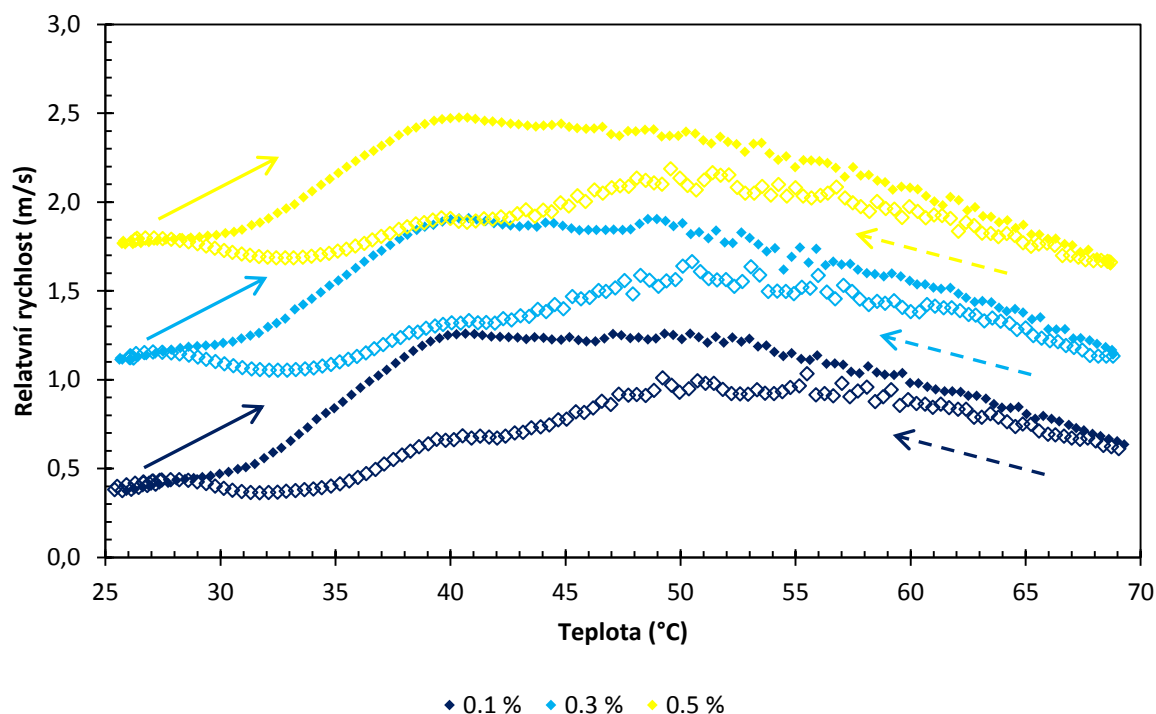
Obrázek X1: Graf znázorňující relativní rychlosti v roztocích 10 – 30 kDa hyaluronanu ve vodě v závislosti na čase při dvou po sobě jdoucích cyklech teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C, při různých koncentracích hyaluronanu)



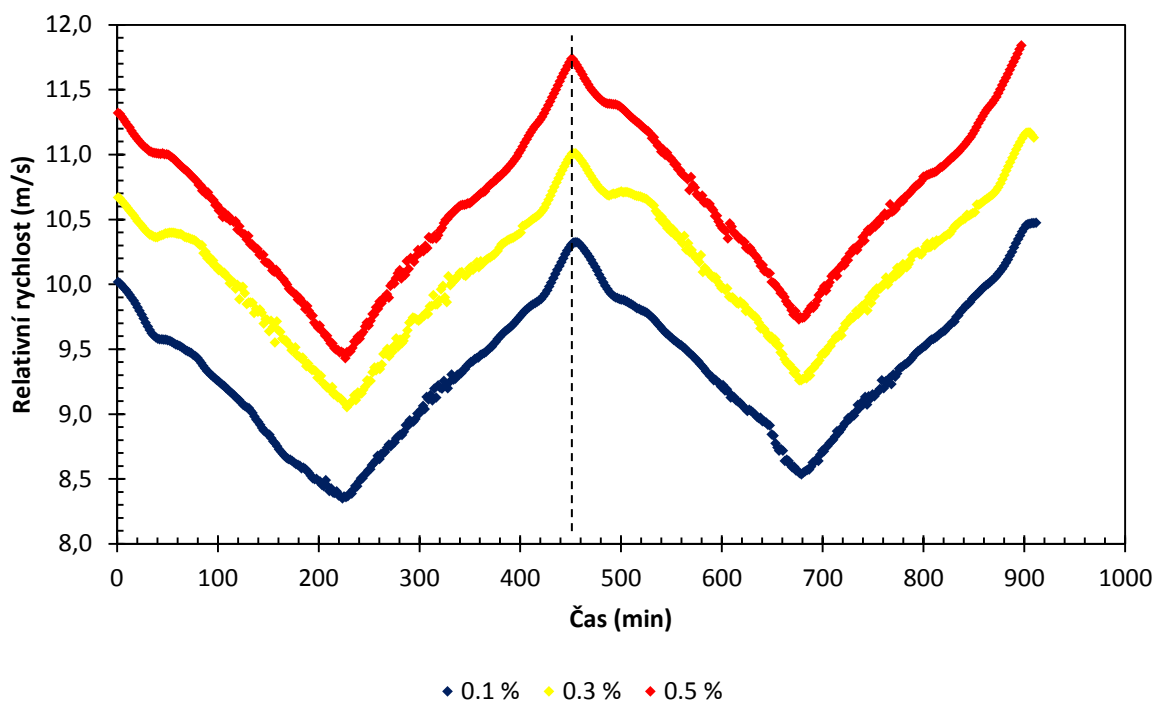
Obrázek X2: Graf znázornění relativní rychlosti v roztocích 1500 – 1750 kDa hyaluronanu ve vodě v závislosti na čase při dvou po sobě jdoucích cyklech teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C, při různých koncentracích hyaluronanu)



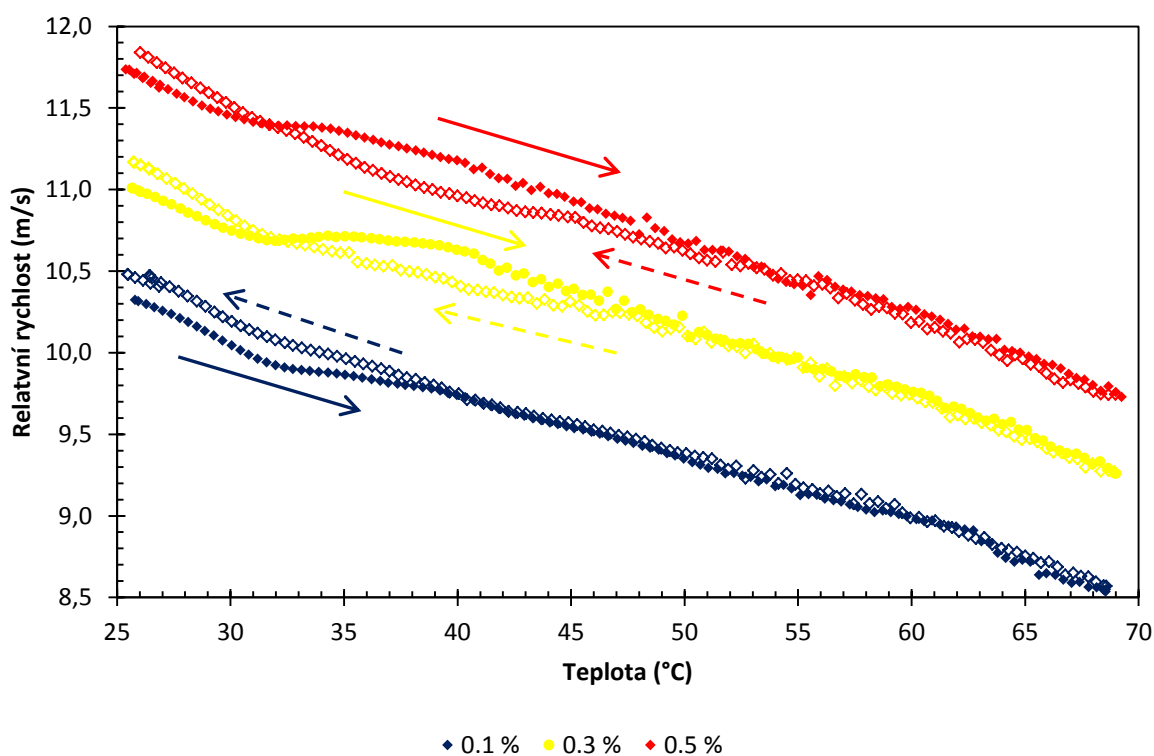
Obrázek X3: Graf znázorňující relativní rychlosti v roztocích 10 – 30 kDa hyaluronanu ve vodě v závislosti na teplotě při jednom cyklu teplotního programu. (11,6 MHz, 25–70 °C a zpět)



Obrázek X4: Graf znázornění relativní rychlosti v roztocích 1500 – 1750 kDa hyaluronanu ve vodě v závislosti na teplotě při jednom cyklu teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C a zpět)



Obrázek X5: Graf znázornění relativní rychlosti v roztocích 1500 – 1750 kDa hyaluronanu ve fyziologickém roztoku v závislosti na čase při dvou po sobě jdoucích cyklech teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C, při různých koncentracích hyaluronanu)



Obrázek X6: Graf znázornění relativní rychlosti v roztocích 1500 – 1750 kDa hyaluronanu ve fyziologickém roztoku v závislosti na teplotě při jednom cyklu teplotního programu. (11,6 MHz, 25 – 70 °C a zpět)